



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ PHA PRODUKUJÍCÍCH KMENŮ V
BIOREMEDIAČNÍCH TECHNOLOGIÍCH**

UTILIZATION OF PHA PRODUCING BACTERIA IN BIOREMEDIATION TECHNOLOGIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Šuráňová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0993/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Zuzana Šuráňová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Využití PHA produkujících kmenů v bioremediačních technologiích

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše
2. Výběr vhodných PHA produkujících kmenů
3. Posouzení vlivu schopnosti akumulace PHA na bioremediační proces
4. Studium biodegradace odpadního peří pomocí vybraných mikrobiálních kmenů

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Zuzana Šuráňová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo studium využití PHA produkujících kmenů v bioremediačních technologiích. Pro tuto studii byly vybrány bakterie *Pseudomonas putida* KT2440 a dva izoláty z půdy zamořené ropou – *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3). V experimentální části byla studována především biodegradace odpadního peří pomocí testovaných mikrobiálních kmenů. Všechny testované bakterie vykazovaly biodegradční aktivitu vůči peří a byly jej schopny využít jako jediný zdroj uhlíku. V průběhu biodegradčního procesu byl monitorován hmotnostní úbytek peří, aktivita proteáz a keratináz, koncentrace bakteriální biomasy, obsah PHA a také pH. Ukázalo se, že nejvyšších keratinázových aktivit i stupně degradace peří bylo dosaženo u bakterie *Pseudomonas putida*. Při kultivaci na odpadním peří žádná z testovaných bakterií neakumulovala detekovatelné množství PHA, nicméně biomasu nakultivovanou při biodegradaci peří je možné využít jako inokulum pro biotechnologickou výrobu MCL-PHA na odpadním oleji a kyselině oktanové. U bakterie *Pseudomonas putida* bylo v tomto experimentálním schématu dosaženo vysokého obsahu MCL-PHA v biomase – téměř 54 % suché hmoty biomasy. V další části práce byla studována biodegradace nafty, ze studovaných bakteriálních kmenů bylo nejvyššího růstu biomasy, a tedy i biodegradčního potenciálu dosaženo u bakterie *Pseudomonas fulva*.

ABSTRACT

The aim of this work is study of utilization of PHA producing bacteria in bioremediation technologies. For this study were used bacteria *Pseudomonas putida* KT2440 and two isolates from soil contaminated by petroleum – *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3). The experimental part describes especially study of feather biodegradation using selected microbial strains. All the tested bacterial strains were capable of feather degradation and utilization as the sole carbon source. During biodegradation experiment, we monitored weight loss of feather, protease and keratinase activity, concentration of bacterial biomass and PHA content as well as pH. The highest biodegradation ability and keratinase activity was observed in *Pseudomonas putida*. None of tested bacteria accumulated detectable amount of PHA during growth on waste feather, nevertheless, bacterial biomass grown during feather degradation can be used as an inoculum for PHA production on waste frying oil and octanoic acid. Using this experimental setup, high PHA content (54 % of cell dry weight) was achieved in *Pseudomonas putida*. Another part of the thesis deals with biodegradation of petroleum oil. The highest capability of growth on this carbon source were determined in *Pseudomonas fulva*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioremediace, biodegradace, biodegradace odpadního peří, polyhydroxyalkanoáty (PHA), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva*

KEY WORDS

Bioremediation, biodegradation, biodegradation of feather waste, polyhydroxyalkanoates (PHA), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva*

ŠURÁŇOVÁ, Z. *Využití PHA produkujících kmenů v bioremediačních technologiích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 65 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto poděkovat panu doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval. Obrovské poděkování patří také Ing. Ivě Pernicové za cenné konzultace, připomínky a pomoc s laboratorními experimenty. Můj dík patří všem, se kterými jsem se setkala v laboratoři, především děkuji za jejich rady, pomoc a vstřícnost. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala mé rodině a blízkým přátelům za trpělivost a podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Biodegradace	9
2.2	Bioremediace.....	10
2.2.1	Výhody bioremediace.....	10
2.2.2	Nevýhody bioremediace	11
2.2.3	Faktory ovlivňující průběh bioremediace.....	12
2.2.3.1	Mikroorganismy pro bioremediační technologie.....	12
2.2.3.2	Faktory životního prostředí.....	12
2.3	Rozdělení bioremediačních technologií	13
2.3.1	In situ bioremediační technologie.....	13
2.3.1.1	Bioverting	13
2.3.1.2	Přirozená atenuace	13
2.3.1.3	Airsparging	13
2.3.1.4	Fytoremediace.....	14
2.3.2	Ex situ bioremediační technologie	15
2.3.2.1	Záhonový způsob (land farming method).....	15
2.3.2.2	Kompostování.....	15
2.3.2.3	Biodegradace v kalu	16
2.4	Biodegradovatelné plasty	17
2.4.1	Biologicky rozložitelné plasty	17
2.5	Polyhydroxyalkanoáty.....	18
2.5.1	Historie polyhydroxyalkanoátů	19
2.5.2	Biologická výroba PHA	19
2.5.3	Vlastnosti a praktické využití polyhydroxyalkanoátů	19
2.5.3.1	Fyzikální vlastnosti polyhydroxyalkanoátů.....	20
2.5.4	Biologická rozložitelnost polyhydroxyalkanoátů.....	22
2.6	Biodegradace odpadního peří.....	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26

3.1	Použité chemikálie, materiál a přístroje	26
3.1.1	Použité bakteriální kmeny	26
3.1.2	Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů	26
3.1.3	Ostatní chemikálie	26
3.1.4	Přístroje.....	27
3.2	Kultivace bakterií	27
3.2.1	Uchování bakteriálních kultur a příprava inokula	27
3.2.2	Živná média	27
3.3	Růstová křivka.....	28
3.3.1	Inokulum.....	28
3.3.2	Minerální médium	29
3.3.3	Stanovení biomasy.....	29
3.3.4	Stanovení obsahu PHA.....	29
3.3.4.1	Stanovení kalibrační křivky	29
3.3.4.2	Stanovení PHA v biomase	29
3.3.5	Stanovení hodnoty pH	30
3.3.6	Degradace peří.....	30
3.3.7	Prvková analýza.....	30
3.3.8	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	30
3.3.9	Stanovení proteázové aktivity	30
3.3.10	Stanovení keratináz pomocí keratinazuru.....	31
3.4	Produkce PHA.....	31
3.5	Biodegradace ropných uhlovodíků.....	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Výsledky růstové křivky	33
4.1.1	Výsledky stanovení biomasy a obsahu PHA	34
4.1.2	Stanovení hodnoty pH v průběhu růstu na odpadním peří	34
4.1.3	Výsledky degradace peří	35
4.1.4	Výsledky prvkové analýzy	38
4.1.5	Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací	38

4.1.6	Výsledky stanovení proteázové aktivity.....	41
4.1.7	Výsledky stanovení keratináz pomocí keratinazuru.....	42
4.2	Produkce PHA.....	44
4.3	Propojení produkce PHA a degradace peří	45
4.3.1	Výsledky stanovení hodnoty pH a biomasy	45
4.3.2	Výsledky stanovení PHA v biomase	46
4.4	Biodegradace ropných uhlovodíků.....	50
4.4.1	Výsledky stanovení biomasy u vybraných kmenů	50
4.4.2	Výsledky hodnoty pH u vybraných kmenů	51
5	ZÁVĚR	53
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63
8	PŘÍLOHY	64

1 ÚVOD

Vzduch, který dýcháme, je znečištěn zdraví škodlivými látkami, které pocházejí ze širokého spektra zdrojů. Nejen vzduch, ale i voda a půda mohou být znečištěny polutanty. Lidská činnost se značně podílí na znečištění životního prostředí. Existují degradovatelné škodlivé látky, ale i perzistentní polutanty. Ropné produkty jsou jedny z nejsledovanějších organických polutantů v jednotlivých složkách životního prostředí. Jednou z možností, jak se zbavit škodlivých látek je proces zvaný bioremediace, což je v podstatě cílená biodegradace.

Bioremediační pochody, které jsou obecně považovány za ekonomicky a ekologicky výhodné, využívají chemický potenciál živých organismů (nejčastěji mikroorganismů), k přeměně toxických látek na netoxické nebo k jejich odstranění. Mikroorganismy využívají tyto polutanty jako substrát. Degradace některých látek ovšem vyžaduje spolupráci více mikrobiálních druhů. Je například známo několik živých organismů, které jsou schopny přeměnit vysoce chlorované perzistentní organické polutanty [1].

Je téměř nemožné si představit dnešní svět bez plastů, avšak velkým problémem je to, že drtivá většina je vyráběna z neobnovitelných zdrojů, především z ropy. Poté, co plasty doslouží, jsou skládkovány, spalovány nebo vyhozeny jako odpad a hromadí se v mořích a oceánech, což značně znečišťuje životní prostředí. Plasty jsou totiž téměř neodbouratelné a v přírodě je jejich poločas rozpadu odhadován na desítky až stovky let. Vyřešení této nevýhody by mohlo být použití polyhydroxyalkanoátů, což je skupina biodegradabilních lineárních polyesterů [2].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou syntetizovány širokou škálou bakterií a mají podobné vlastnosti jako syntetické plasty, jako např. polypropylen či polyethylen. Jednou z hlavních výhod těchto materiálů je jejich biokompatibilita, což je předurčuje k lékařským aplikacím [3].

Každý týden se po celém světě zpracovává více než 400 milionů kuřat. Peří, jakožto vedlejší odpadní produkt, je bohatým zdrojem bílkovin, zejména keratinu [4]. Peří není ziskové ani šetrné k životnímu prostředí, a to i přesto, že je vysoce bohaté na obsah bílkovin. Hlavní nevýhodou je jejich pomalé odbourávání v přírodě, a proto je biodegradace tohoto odpadního produktu nesmírně důležitá [5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biodegradace

Biodegradace je proces, kterému podléhají nízko i vysokomolekulární látky přírodního i syntetického původu. Během biodegradace se tyto látky rozkládají působením živých organismů, nejčastěji mikroorganismů, které využívají rozkládané látky a materiály jako zdroj uhlíku a energie pro pokrytí svých metabolických potřeb. Přírodě značně prospěšná je tzv. mineralizace, což je úplná biodegradace organické látky. Tato úplná biodegradace představuje oxidaci původní organické sloučeniny primárně až na oxid uhličitý a vodu, čímž poskytuje energii a uhlík pro růst a dělení buněk biodegradace aktivní mikroflóry. Biodegradace organické sloučeniny může probíhat jednak za aerobních nebo za anaerobních podmínek. V půdě nebo kompostu spolu s různými mikroorganismy dochází jak k aerobní, tak aerobní biodegradaci polymerů. Při anaerobní biodegradaci je organická hmota metabolizována pomocí mikroorganismů, avšak v nepřítomnosti kyslíku [6–8].

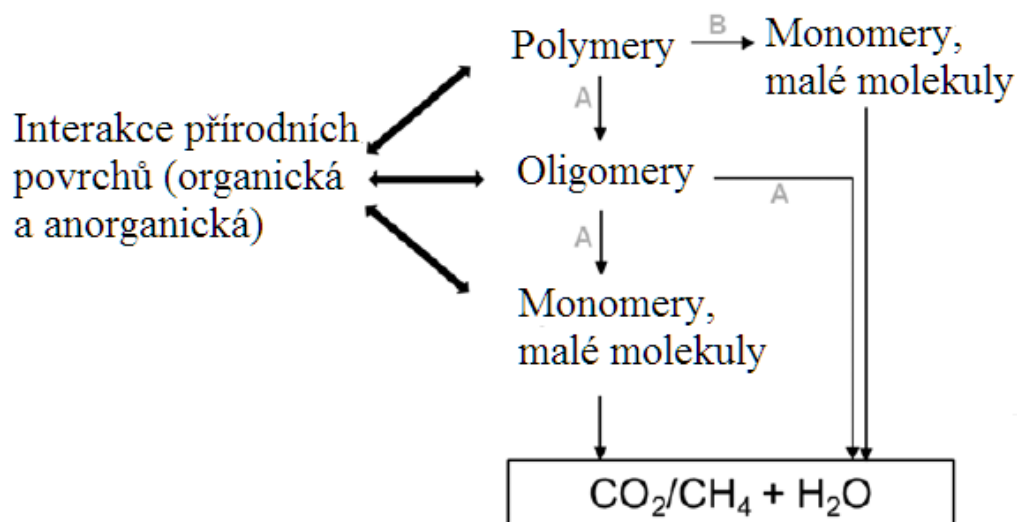
Existuje řada syntetických sloučenin, které jsou do prostředí zavlečeny a jsou vysoce toxické nejen pro člověka a zvířata, ale i pro mikroorganismy. Z toho důvodu nemusí dojít v prostředí k mineralizaci, tedy jejich úplnému odbourání. U spousty případů jsou pozorovány abiotické, popř. i biologické, tzv. transformační procesy, které vedou k tvorbě nových organických látek vznikajících přeměnou původní organické toxické látky. Produkt této transformace se však v prostředí obvykle hromadí a dlouhodobě perzistuje. Abiotická či biologická transformace organických polutantů je ve většině případů nežádoucí, protože vytváří novou, po chemické stránce neznámou kontaminaci [7].

Využívaným procesem je mikrobiální degradace. Velké množství látek, které již byly někdy připraveny v laboratoři, mohou být mikrobiologicky modifikovány nebo rozloženy v přirozeném prostředí. V kontaminovaných půdách, oceánech, odpadních vodách, na skládkách, ve spodních i povrchových vodách a sedimentech všemožného původu je možnost pozorovat degradační procesy. Bylo prokázáno, že na degradaci polutantů v těchto prostředích se značně podílejí některé bakterie, houby a protozoa, které přímo či nepřímo rozkládají a využívají řadu přirozených organických látek a syntetik [7].

Série degradačních kroků je v zásadě stejná, ať už je zdrojem uhlíku jednoduchý cukr, například glukóza, rostlinný polymer jako třeba celulóza nebo syntetická molekula organopolutantu. Každý z degradačních kroků je katalyzován specifickým enzymem. Enzymy mohou být umístěny uvnitř buňky nebo jsou z buňky uvolňovány a pomáhají v počátcích biodegradace. Extracelulární enzymy jsou umístěny vně buňky a jsou důležité zejména pro degradaci makromolekul, např. celulózy [6].

Rozpustnost polymerů ve vodě je faktor, který navyšuje biodegradabilitu. Většina z biologicky odbouratelných polymerů je však ve vodě nerozpustná. Jejich hlavní nevýhodou je příliš velký rozměr, a proto nemohou projít buněčnou membránou organismů. Z tohoto důvodu začíná biodegradace těchto polymerů štěpením řetězce pomocí extracelulárních enzymů (např. lipázami a esterázami), které jsou vylučovány mikroorganismy. Polymerní řetězce se štěpí na menší frakce, které mohou být mikroorganismy absorbovány a metabolizovány (viz Obr. 1). Štěpení může být buď endolytické (cesta A), jehož výsledkem jsou oligomery a následně monomery. Další štěpení může být exolytické, které vede přímo

k monomerům (cesta B). Buňky mikroorganismů získávají procesem mineralizace primárně energii. V případě vysokomolekulárních látek je proces biodegradace procesem povrchové eroze, jelikož enzymy jsou natolik velké, že nemohou difundovat do biologicky odbouratelného polymeru. Mikrobiální degradace je ovlivněna vlhkostí, množstvím kyslíku, světlem a teplotou. [8–12].



Obr. 1: Mechanismus biodegradace [8]

2.2 Bioremediace

Bioremediace, též známá jako biologický rozklad, je jeden z případů technologického využití procesu biodegradace. Biologický rozklad probíhá díky působení biologických činitelů, mezi které patří hlavně mikroorganismy, hmyz či hlodavci. Bioremediace je biodegradační metodou, jejíž hlavním úkolem je ozdravení kontaminovaného prostředí [6–7].

V rámci bioremediace má dojít k úplnému rozkladu nebo přeměně různých nežádoucích chemických sloučenin na látky méně nebezpečné. Bioremediaci je možno využít pro čištění odpadních a podzemních vod, kalů, půdy a plynů. Postupy této technologie lze rozdělit na technologie, které se realizují na místě znečištění neboli *in situ* bioremediace, a technologie, které jsou realizovány ve speciálních reaktorech či zabezpečených plochách, tzv. *ex situ* bioremediace [6].

2.2.1 Výhody bioremediace

Bioremediace nabízí několik výhod oproti běžným sanačním technikám, mezi které patří skládkování nebo spalování. Tabulka č. 1 udává chemické třídy a jejich schopnost či neschopnost podléhat biodegradaci. Jak již bylo výše zmíněno, je možno provést bioremediaci přímo na místě, čímž se značně eliminují náklady na dopravu, což je z ekonomického, ale i ekologického hlediska pochopitelně žádoucí [13].

Tabulka č. 1: Chemické třídy a jejich náchylnost k bioremediaci [13]

Chemická třída	Příklady	Podmínky pro bioremediační proces
Aromatické uhlovodíky	Benzen, toluen	Aerobní a anaerobní
Ketony a estery	Aceton, methylethylketon (MEK)	Aerobní a anaerobní
Ropné uhlovodíky	Topný olej	Aerobní
Chlorovaná rozpouštědla	Trichlorethylen, tetrachlorethylen	Aerobní, anaerobní (reduktivní dechlorace)
Polyaromatické uhlovodíky	Antracen, benzo(a)pyren, kreosot	Aerobní
Polychlorované bifenily	Arochlor	Nejsou snadno rozložitelné
Organické kyanidy	Izokyanát	Aerobní
Kovy	Kadmium	Nerozložitelné (biosorpce)
Radioaktivní materiály	Uran, plutonium	Nerozložitelné
Žiraviny	Anorganické kyseliny, žiraviny	Nerozložitelné
Azbesty		Nerozložitelné

Proces biodegradace a bioremediace je možné aplikovat i na komplexní odpadní organickou hmotu jako je například sláma, kukuřičné klasy, bavlněné stonky, různé trávy a rákosové stonky, cukrová třtina, kokosové a banánové zbytky, kávové slupky, arašídové skořápky, odpadní papír, piliny a třísky ze dřeva jsou jen některé příklady zbytků a vedlejších produktů, které je možné buď rozložit anebo pomocí různých procesů konvertovat na rozličné produkty s vysokou přidanou hodnotou [13].

2.2.2 Nevýhody bioremediace

Bioremediace má však i svá omezení a nevýhody. Některé chemické látky, například vysoce chlorované sloučeniny a těžké kovy, jsou vysoce stabilní, a proto jsou velice rezistentní či nesnadno biologicky odbouratelné. Pro některé chemické látky může mikrobiální degradace nebo transformace vést až ke zvýšení produkce toxických látek. Příkladem je trichlorethylen (TCE), který za anaerobních podmínek podstupuje řadu mikrobiologických reakcí, které mají za následek postupné odstraňování atomů chloru z molekuly. Tento proces je znám pod pojmem dehalogenace. Konečným produktem této řady reakcí je vinylchlorid (VC), což je známý karcinogen. Pokud je tedy bioremediace použita bez řádného pochopení problematiky

mikrobiálních procesů, metabolických a chemických drah, tak to může vést k ještě horší situaci [13].

Bioremediace je vědecky náročná procedura, která musí být přizpůsobena místním specifickým podmínkám kvůli minimalizování dopadu na životní prostředí. Počáteční náklady proto mohou být vyšší než u běžných technologií. Je zapotřebí vybrat vhodné místo, charakterizovat proces a posoudit proveditelnost bioremediace. Stejně jako u jiných sanačních technologií je zde potřeba rozsáhlého monitorování místa během realizace projektu, aby byla posouzena účinnost bioremediační techniky [13].

2.2.3 Faktory ovlivňující průběh bioremediace

Kontrola a optimalizace bioremediačních procesů je složitý systém mnoha faktorů. Existence mikrobiální populace schopné degradovat polutanty je jedním z těchto faktorů. Mezi další faktory patří: faktory životního prostředí (typ půdy, teplota, pH, přítomnost kyslíku nebo jiných donorů a živiny) a biologická dostupnost kontaminantů [14].

2.2.3.1 Mikroorganismy pro bioremediační technologie

Lze použít téměř všechny mikroorganismy z okolního prostředí. Mikroby mají schopnost se přizpůsobit prostředí a růst i při teplotách pod bodem mrazu, při extrémně vysokých teplotách, v pouštních podmínkách, ve vodě, v anaerobních podmínkách, v podmínkách přebytku či nedostatku kyslíku nebo na jakémkoliv odpadu. Mezi hlavní požadavky pro jejich růst patří zdroj energie a zdroj uhlíku. Jedno z dělení mikroorganismů je následovné: aerobní, anaerobní, ligninolytické houby a methylofily [14].

2.2.3.2 Faktory životního prostředí

Živiny

Mikroorganismy přítomné v kontaminované půdě nebývají vždycky v takovém množství, jaké je potřeba pro bioremediaci, a proto musí být často podpořen jejich růst a aktivita. Biostimulace zahrnuje přidání živin a kyslíku k původním mikroorganismům. Přidané živiny jsou základními stavebními kameny a umožňují tak mikrobům vytvořit potřebné enzymy, aby byly schopni si poradit s kontaminanty. V buňce je uhlík potřeba ve větším množství než ostatní prvky. Uhlík, vodík, kyslík a dusík představují až 95 % hmotnosti celé buňky [14]. Procentuální množství prvků v mikrobiální buňce zobrazuje Tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Složení mikrobiální buňky [14]

Prvek	Procentuální zastoupení [hmotnostní %]	Prvek	Procentuální zastoupení [hmotnostní %]
Uhlík	50	Sodík	1
Dusík	14	Vápník	0,5
Kyslík	20	Hořčík	0,5
Vodík	8	Chlorid	0,5
Fosfor	3	Železo	0,2
Síra	1	Ostatní	0,3
Draslík	1		

2.3 Rozdělení bioremediačních technologií

Bioremediaci lze využívat k řešení určitého environmentálního problému mnoha různými způsoby. Například bioreaktory jsou používány k dekontaminaci znečištěné vody (např. průmyslové tekuté odpady, kontaminovaná podzemní voda), k odstraňování par polutantů (rozpouštědla odpařená z kontaminovaných podpovrchových lokalit, vzduch z továrenských provozů) a k dekontaminaci pevných frakcí v kašovitých směsích (např. vytěžená půda, sedimenty, rostlinný materiál, kal) [15].

2.3.1 *In situ* bioremediační technologie

Tyto techniky jsou prováděny přímo v kontaminované lokalitě. Není proto nutné kontaminovanou vodu či zeminu nikam převážet, čímž odpadají náklady na dopravu a zajištění prostoru na zpracování. Tento druh bioremediace je doprovázen malým nebo vůbec žádným narušením struktury půdy. Výhoda *in situ* technologií je především v tom, že jsou relativně levné. Nevýhoda spočívá v obtížné kontrolovatelnosti. Tabulka č. 3 shrnuje výhody a nevýhody technologií používaných pro sanaci půdy. Mezi metody bioremediace *in situ* patří bioverting, podpořená bioremediace, přirozená atenuace a fytořemediace [6, 16–17].

2.3.1.1 *Bioverting*

Bioverting je nedestruktivní technologie aplikovaná nejčastěji v nesaturované zóně půdy, tj. nad hladinou podzemní vody. Jedná se v podstatě o zavedení vzduchu do půdy, přičemž vháněný vzduch usnadňuje tekání některých organických kontaminantů a tím tak zajišťuje vhodné prostředí pro biodegradaci méně těkavých látek. Mezi hlavní požadavky patří zajištění optimálního přísunu vzduchu. Pro přísun vzduchu do nesaturované zóny mohou být využívány horizontální vrty nebo vertikální vrty, případně jejich kombinace. Metoda bioverting je vhodná pro odstraňování kontaminace zapříčiněné ropou a ropnými uhlovodíky. Teplota a pH půdy může značně ovlivnit průběh celého procesu odbourávání nežádoucích znečišťujících látek. Proces biovertingu lze maximalizovat pomocí nižší rychlosti proudění vzduchu a optimalizací podmínek pro mikrobiální růst zvýšením vlhkosti a přidáním anorganických živin [6, 18–19].

2.3.1.2 *Přirozená atenuace*

Přirozená atenuace je přirozená úroveň biodegradace kontaminantu, probíhající bez jakékoli vnější stimulace či působení. Příčiny poklesu koncentrace cílového polutantu mohou být různé. Tuto metodu lze využít pouze pro biodegradovatelné organické látky. Stěžejní v této metodě je průzkumná fáze, při které jsou důležitá tři kritéria: výsledky minulých průkopnických prací potvrzující pokles kontaminace, geologické a/nebo geochemické údaje demonstrující průběh procesu přirozeného snižování kontaminace a laboratorní studie mikrokosmu (tj. odebrané části půdy i s rostlinami a půdními organismy). Mezi eventuální výhody přirozené atenuace patří menší tvorby a transport odpadů. Mezi nevýhody patří hlavně závazek na dlouhodobé monitorování a s tím i spojené náklady [6, 15].

2.3.1.3 *Airsparging*

Při této technologii je vzduch vháněn pod hladinu podzemní vody. Airsparging je tedy určen především k čištění podzemních vod, které jsou znečištěny ropnými uhlovodíky, těkavými

organickými sloučeninami, pesticidy, herbicidy nebo organickými látkami. Zařízení, které se zde využívá je levné, jednoduché, nevyžaduje vysokou údržbu a může být ponecháno bez dozoru. Tento proces se řadí mezi nejlevnější bioremediační techniky. Airsparging není použitelný v místech, kde se vyskytují ve vysoké koncentraci anorganické soli, těžké kovy či organické sloučeniny [13].

2.3.1.4 Fytoremediace

Fytoremediace je založena na využití zelených rostlin. Zelené rostliny jsou zde využívány k přesunu, akumulaci a odstranění polutantů ze životního prostředí. V závislosti na druhu znečišťujících látek (elementární nebo organické), existuje několik mechanismů (akumulace nebo extrakce, degradace, filtrace, stabilizace a těkání) zapojených do fytoremediace. Mezi anorganické polutanty, které jsou rostliny schopny hromadit, patří těžké kovy (mangan, zinek, kobalt, olovo, kadmium a uran). Mezi organické látky zase patří ropné uhlovodíky, muniční odpady, nitrosloučeniny, chlorovaná rozpouštědla, bojové chemické látky, chlorované pesticidy a jiné. Pro použití zařízení fytoremediátoru je nutné, aby znečišťující látky byly lehce dostupné kořenovému systému rostlin a toto zařízení by mělo být odolné vůči škůdcům [6, 16, 20].

Tabulka č. 3: Výhody a nevýhody biologických technologií používaných pro sanaci půdy [17]

Technologie	Výhody	Nevýhody
Záhonový způsob	<ul style="list-style-type: none"> - relativně jednoduchý design a implementace - krátké doby ošetření (za optimálních podmínek 6 měsíců až 2 roky) 	<ul style="list-style-type: none"> - snížení koncentrace, která je vyšší než 95 % a koncentrace nižší než 0,1 ppm, je obtížné dosáhnout - požadovaná oblast je velká - prach a generování par při provzdušňování může způsobit problémy s kvalitou ovzduší
Bioverting	<ul style="list-style-type: none"> - využívá snadno dostupná zařízení a u této techniky je snadná instalace - minimální narušení místa ošetření - snadná kombinace s jinými technologiemi (např. s airspargingem) 	<ul style="list-style-type: none"> - vysoké koncentrace polutantů mohou být pro mikroorganismy toxické - občas vyžaduje živiny a vhánění vzduchu vrty - ošetřuje pouze nesaturované zóny půd; pro ošetření saturovaných zón a podzemních vod potřebuje další metody
Přirozená atenuace	<ul style="list-style-type: none"> - jednoduché použití v kombinaci s jinými technologiemi - vytváření méně sanačních odpadů - menší dopad na životní prostředí 	<ul style="list-style-type: none"> - charakterizace místa může být nákladná a složitá - vzhledem k monitorování může být aktivní remediace ekonomičtější - veřejnost nemusí správně pochopit účinnost procesu

Technologie	Výhody	Nevýhody
Fytoremediace	<ul style="list-style-type: none"> - mnohem levnější než běžné techniky 	<ul style="list-style-type: none"> - jedná se pouze o sezónní technologii - pouze do nízké hloubky
Biosparging	<ul style="list-style-type: none"> - snadno dostupné vybavení - konkurenceschopné - nevyžaduje žádné odstranění, zpracování, nebo vypouštění podzemních vod 	<ul style="list-style-type: none"> - některé interakce mezi složitými chemickými, fyzikálními a biologickými procesy nejsou dobře známy

2.3.2 *Ex situ* bioremediační technologie

Jedna z hlavních výhod *ex situ* bioremediace je, že trvá méně času než *in situ* bioremediace. Oproti metodám *in situ* umožňují tyto metody lepší a efektivnější kontroly procesu, které jsou důležité zejména pro správné promíchání půdy. Metody *ex situ* dosahují zajištění zvýšené rozpustnosti organických látek a při těchto metodách dochází ke zlepšenému kontaktu mezi mikroorganismy a kontaminanty. Další výhodou je snazší dodávání živin a jejich distribuce. Mezi nevýhody patří velké nároky na energii, nutnost přemístění zeminy i její úprava a separace vodního a pevného podílu suspenze v závěru procesu. I přes vysoké náklady těchto technologií jsou tyto postupy levnější než fyzikální způsoby dekontaminace, a navíc jsou *ex situ* bioremediace rychlejší. Tyto technologie jsou nejčastěji využívány pro dekontaminaci půdy znečištěné ropou a ropnými produkty [6].

2.3.2.1 Záhonový způsob (*land farming method*)

Vzhledem k nízké ceně a menším provozním požadavkům, se řadí záhonový způsob mezi nejjednodušší bioremediační techniky. Zemina je zemědělsky obdělávána na speciálních plochách (je hnojena, zavlažována, vzdušněna prooráváním či přehazováním). Může být pouze fertilizována nebo inokulována speciálními mikrobiálními preparáty. Pro úspěšnou biodegradaci ropných uhlovodíků lze odvodit nutné množství dusíku a fosforu z koncentrace kontaminující uhlíkaté látky. Degradace je většinou prováděna v prostorách opatřených nepropustnou podlahovou krytinou s drenážemi pro odvádění přebytečné kontaminované vody do podzemních nádrží pro opakované zkrápění biopole. Vzduch, který je v průběhu biodegradace znečišťován lehkými uhlovodíky, je dočišťován přes chemické či biologické filtry [7, 16, 21].

2.3.2.2 Kompostování

Kompostování je řízený biologický proces, při kterém jsou organické materiály degradovány nebo utilizovány mikroorganismy, což vede k produkci organických a/nebo anorganických vedlejších produktů a energie ve formě tepla. Zemina je smíchána s pevným organickým materiálem, jako například slámou, pilinami, kůrou, hnojem, kejdou, hoblinami a bývá obohacena zdrojem dusíku a fosforu. Materiál je pak navršen do vysokých hromad (znázorněné na Obr. 2) a je provzdušňován mechanicky nebo soustavou trubek napojených na kompresor. K rychlosti degradace polutantu během kompostování přispívá i vzrůst teploty materiálu

v důsledku množení mikroorganismů na pevném organickém materiálu. Tento způsob degradace bývá používán u půd kontaminovaných chlorfenoly, herbicidy, pesticidy, polycyklickými aromatickými uhlovodíky či aromatickými nitrosloučeninami. V současné době je kompostování široce využíváno ke zpracování odpadů z různých výroby a komunálního odpadu [7, 17].

Při vermikompostování jsou pomocí žížal přeměněny biologicky rozložitelné látky na vermikompost, což je velmi kvalitní organické hnojivo. Žížaly druhu *Eisenia fetida*, *Eisenia tetraedra* a *Lumbricus terrestris* (žížala obecná) odstraňují těžké kovy (kadmium, olovo, měď a rtuť), pesticidy a organické mikropolutanty (PAH) z půdy. Díky vynikajícím vlastnostem žížal bývá vermikompostování použito i k degradaci organických polutantů, mezi které patří polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenylly a atrazin [13].



Obr. 2: Příprava zeminy pro kompostování a měření její teploty [7]

2.3.2.3 Biodegradace v kalu

Tato technika je využívána především pro čištění kontaminovaných půd, kalů samotných nebo sedimentů. Může probíhat buďto přímo v lagunách nebo ve speciálních kalových reaktorech. Jsou známy kalové reaktory, které se používají pro kontaminované půdy, kaly nebo sedimenty. Metoda v reaktoru je vhodná především pro kontaminace, kde vznikají nebezpečné meziprodukty či nebezpečné plynné sloučeniny, jejichž produkce může být sledována. Kal je míchán a vzdušněn. Většina reaktorů využívá uměle připravovaných konsorcií mikroorganismů [6–7].

Výhodou těchto velmi nákladných zařízení je podstatné zkrácení doby sanace kontaminovaného materiálu a především snížení rizik, která nelze vyloučit během přírodních procesů na otevřené lokalitě. V lagunách mohou být degradovány například fenoly a krezoáty [6-7]. Lagunu kontaminovanou fenoly je možnost vidět na Obr. 3.



Obr. 3: Laguna kontaminovaná fenoly [7]

2.4 Biodegradovatelné plasty

Plasty mají mnohostranné vlastnosti, mezi které patří síla, lehkost, trvanlivost a odolnost vůči degradaci. Proto se staly neodmyslitelnou součástí dnešního života, ale odpad z nich je celosvětovým problémem, který je třeba řešit. Spalování plastů je nebezpečné a může se prodražit. Recyklace je zase zdoluhavá a třídění je taktéž časově náročné. Kromě toho, přítomnost široké škály přísad, jako jsou barviva, nátěry a plniva omezují další použití recyklovaného materiálu. Z hlediska znečišťování prostředí jsou konvenční plasty méně výhodné než plasty rozložitelné [22].

Rozložitelné plasty mohou být rozděleny do tří kategorií:

1. Chemicky syntetizované polymery: Do této kategorie spadá polyglykolová kyselina, kyselina polymléčná, poly (ϵ -kaprolakton), polyvinylalkohol a poly(ethylenoxid). Tyto polymery jsou náchylné k enzymatickému nebo mikrobiálnímu rozkladu.

2. Rozložitelné plasty na bázi škrobu: U tohoto typu plastů se ke škrobu přidávají plastifikátory a nejružnější modifikátory, které propůjčují škrobu termoplastické vlastnosti. Půdní mikroorganismy jsou velmi často schopny snadno degradovat škrob, čímž ale poškodí polymerní matrice, a to má za následek významné snížení doby degradace. Problémem těchto plastů je jejich obtížně definovatelná rozložitelnost a taktéž špatné vlastnosti při kontaktu s vodným prostředím.

3. Polyhydroxyalkanoáty (PHA): Jedná se o jediné kompletně odbouratelné polymery připravené zcela z obnovitelných surovin. Jsou zcela degradovatelné na vodu a oxid uhličitý za aerobních podmínek a na metan za anaerobních podmínek, a to především pomocí půdních, mořských, sladkovodních mikroorganismů a mikroorganismů z odpadních vod [22].

2.4.1 Biologicky rozložitelné plasty

Biologicky rozložitelných plastů je známo několik, ale svou pozornost si získaly především polyhydroxyalkanoáty, polylaktidy (PLA) a polyglykolidy (PGA). Polylaktidy a polyglykolidy se řadí mezi termoplasty a polyestery. Nízkomolekulární PLA a PGA jsou vyrobeny přímou

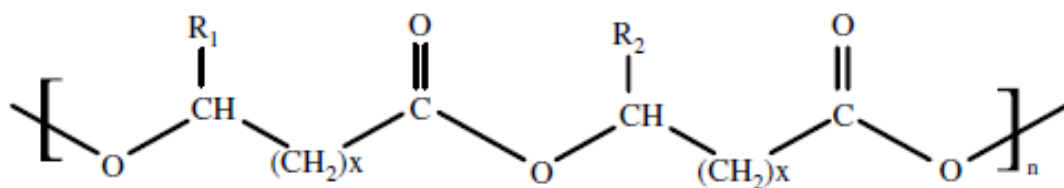
polymerací laktidu a glykolidu. Vysokomolekulární polylaktidy a polyglykolidy jsou vyrobeny polymerací za otevření kruhu laktidu a glykolidu, což jsou citlivé diestery příslušných kyselin. Polyglykolová a polymléčná kyselina mají degradační dobu několik dnů až týdnů. Doba degradace PLA a PGA se pohybuje od několika měsíců až po několik let [23].

2.5 Polyhydroxyalkanoáty

Syntetické plasty mají spoustu pozitivních vlastností, ale poté co doslouží, tvoří těžce rozložitelný odpad, který přispívá k environmentálním problémům. Díky tomu, že životní prostředí je neustále znečišťováno, se vědci začali zabývat vývojem a výrobou biologicky rozložitelných plastů. Biologické materiály jako jsou polynukleotidy, polyamidy, polysacharidy, polyoxoestery, polyanhydridy nebo polyfenoly jsou potenciálními kandidáty pro náhradu syntetických plastů. Za jednu z nejslibnějších náhrad jsou považovány i plasty produkované bakteriemi – polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA patří mezi polyoxoestery a disponují termoplastickými vlastnostmi [24–26].

Tyto unikátní bioplasty jsou syntetizovány širokou škálou bakterií při nevyvážených růstových podmínkách. Některé bakterie jsou schopny produkovat obrovské množství PHA poté, co si vyčerpají základní živiny jako je dusík, fosfor a hořčík. PHA představují ideální skladiště pro energii a uhlík, zejména díky své nerozpustnosti uvnitř bakteriální cytoplazmy. Ukázalo se, že bakterie obsahující PHA jsou schopny přežít během hladovění mnohem delší dobu než bakterie neobsahující PHA. Důvodem je energetická rezerva zpomalující buněčnou autolýzu a tím i její mortalitu [24, 27].

Polyhydroxyalkanoáty jsou rozděleny do dvou skupin na základě počtu uhlíkových atomů v jejich monomerních jednotkách. První skupina, tzv. short-chain-length (SCL) se skládá z monomerů s 3 až 5 atomy uhlíku a druhá skupina, tzv. medium-chain-length (MCL) obsahuje monomery s 6 až 14 atomy uhlíku. Příklady třídy PHA s krátkým řetězcem jsou poly(3-hydroxybutyrát) a poly(4-hydroxybutyrát). Příklady třídy PHA se středně dlouhým řetězcem jsou homopolymery poly(3-hydroxyhexanoát), poly(3-hydroxyoktanoát) a heteropolymer poly(3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoktanoát) [28]. Hlavní struktura polyhydroxyalkanoátů je vyobrazena na Obr. 4.



Obr. 4: Hlavní struktura polyhydroxyalkanoátů [29]

V buňkách se polyhydroxyalkanoáty vyskytují ve formě inkluzí, které se nacházejí v cytoplazmě a jejichž typická velikost je $0,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$. Tyto inkluze mohou být vizualizovány několika způsoby. Jedním ze způsobů je vizualizace pomocí světelného mikroskopu díky jejich vysoké refraktivitě nebo mohou být pozorovány pomocí elektronového mikroskopu. Nativní PHA inkluze mohou být obarveny barvivem Sudanová čerň nebo Nilskou modří, která vykazuje

silnou oranžovou fluorescenci při vlnové délce 460 nm. Tyto metody barvení mohou být použity k identifikaci polyhydroxyalkanoátů [22, 30–31].

2.5.1 Historie polyhydroxyalkanoátů

Poly(3-hydroxybutyrát) je neznámější a nejvíce prostudovaný polyhydroxyalkanoát. P(3HB) objevil Lemoigne a roku 1926 popsal analytickou metodu pro jeho analýzu. Tento vědec charakterizoval polyhydroxybutyrát obsažený v grampozitivní bakterii *Bacillus megaterium*. Ačkoli Lemoigneho metoda byla velmi přesná, bylo potřeba i většího množství biomasy. Za účelem překonání tohoto problému, Williamson a Wilkinson (1958) rozvinuli spektrofotometrickou metodu, která byla podstatně rychlejší než metoda výše zmíněná. Buňky bakterie *Bacillus* byly ošetřeny chlornanem sodným. Po ošetření vznikl zakalený roztok, který byl změřen spektrofotometricky. Nicméně, metoda musela být optimalizována pro každou novou bakterii a olejovou inkluzi [23, 32].

Více specifická analytická metoda byla objevena v roce 1960 a 1961. Slepecky a Law pracovali s vyextrahovaným polymerem z *Bacillus megaterium* a koncentrovanou kyselinou sírovou pro kvantitativní převedení poly(3HB) na krotonovou kyselinu. Díky α,β -nenasycené vazbě má krotonová kyselina absorpční maximum při 235nm v koncentrované kyselině sírové. Tato vlastnost byla použita pro ultrafialové (UV) měření. Historie PHA je však velmi široká [32].

S postupem času a přibývajícím znalostmi o polyhydroxyalkanoátech bylo zjištěno, že lze kultivovat bakterie na různých substrátech jako jsou oleje, sacharidy či organické kyseliny a inkorporovat tak různé monomerní jednotky do struktury polyhydroxyalkanoátů, čímž se významně zlepši vlastnosti získaného polymeru. V roce 1976 se společnost Imperial Chemical Industry (ICI Ltd., UK) rozhodla průmyslově vyrábět poly(3-hydroxybutyrát), jako alternativu pro náhradu některých tradičních plastů. Tato společnost vyvinula kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), který je na trhu uveden pod názvem BiopolTM a v roce 1996 se používal například jako materiál na výrobu lahví pro šampony [33].

2.5.2 Biologická výroba PHA

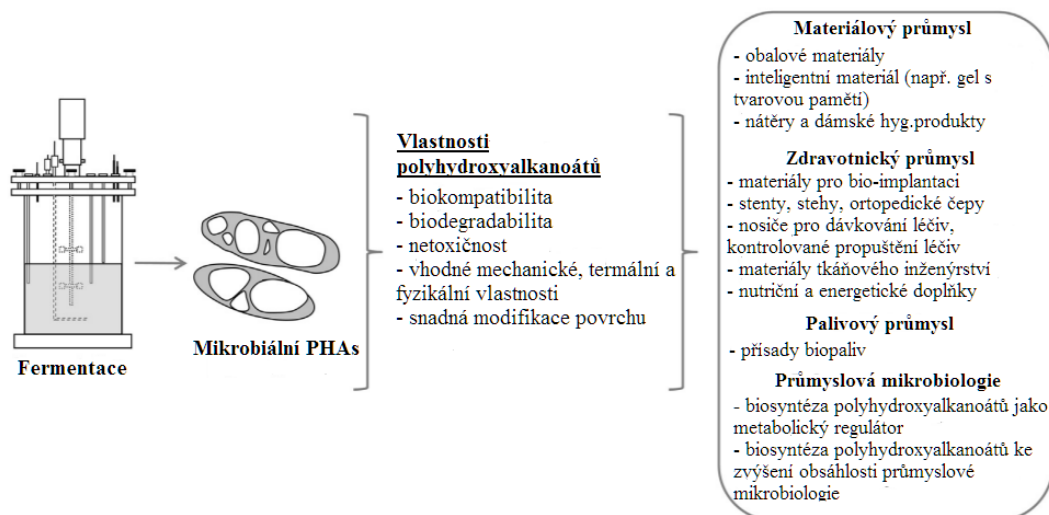
Bakterie, které jsou používány pro produkci polyhydroxyalkanoátů mohou být rozděleny do dvou skupin, a to na základě jejich kultivačních podmínek, které jsou požadovány pro jejich syntézu. První skupina bakterií vyžaduje limitaci některé ze základních živin, jako například dusíku, fosforu, hořčíku či síry pro syntézu PHA z nadbytku zdroje uhlíku. Do této skupiny patří například bakterie *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas extorquens* a *Pseudomonas oleovorans*. Druhá skupina zahrnuje bakterie *Alcaligenes latus*, mutantní kmen *Azotobacter vinelandii* a rekombinantní *E. coli*. Tato skupina nevyžaduje limitaci živin pro syntézu PHA a u těchto bakterií se může hromadit polymer již během růstu. Výběr mikroorganismů pro produkci PHA by měl být založen na několika faktorech včetně schopnosti buňky využívat levný zdroj uhlíku [22, 34].

2.5.3 Vlastnosti a praktické využití polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty mají podobné vlastnosti jako polypropylen nebo polyethylen a značně se liší v chemických a fyzikálních vlastnostech. Zároveň mají široký rozsah potenciálních

aplikací, protože disponují unikátními vlastnostmi. Mezi ty nejdůležitější patří biologická kompatibilita, biologická rozložitelnost a zanedbatelná cytotoxicita k buňkám. Největší výhodou těchto termoplastů je jejich výroba z obnovitelných zdrojů, tudíž tak neznečišťují životní prostředí, jako je například znečišťují syntetické polymery. PHA jsou vysoce krystalické a mají vysoký stupeň polymerace [24, 35–36].

Ze začátku byly polyhydroxyalkanoáty používány jen pro výrobu jednorázových obalů. Nyní jsou používány v lékařství (stehy, stenty, polymerní filmy, farmaceutické výrobky používané v chirurgii), tkáňovém inženýrství (implantace) [35] a dalších oblastech, které jsou shrnuty na Obr. 5.



Obr. 5: Vlastnosti a použití polyhydroxyalkanoátů [37]

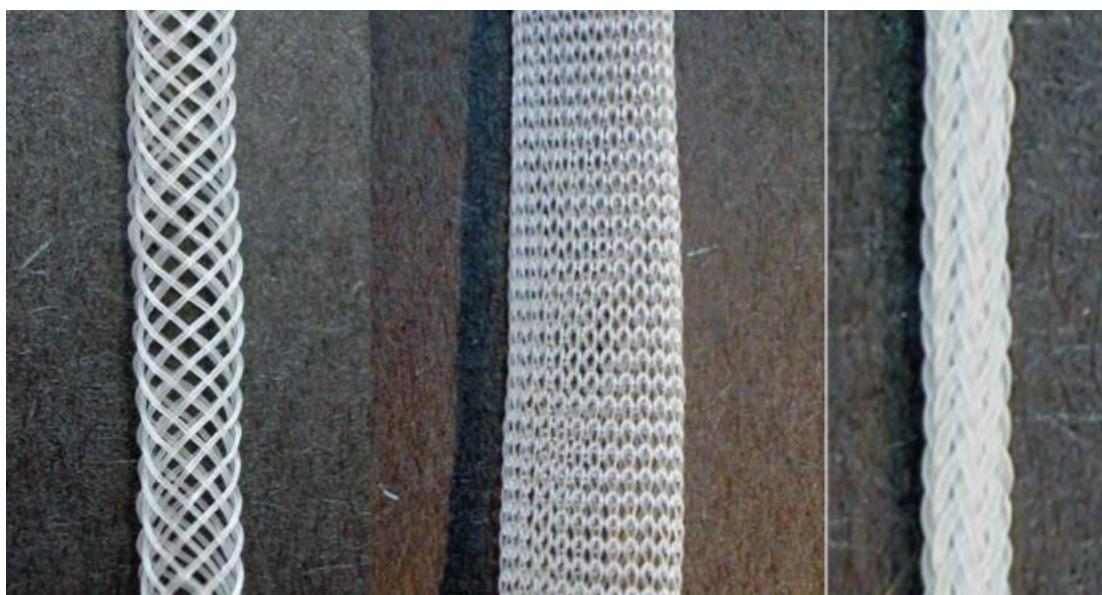
2.5.3.1 Fyzikální vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

V závislosti na zastoupení monomerů lze získat řadu polyhydroxyalkanoátů s požadovanými vlastnostmi. Existují polymery křehké a krystalické nebo pružné a elastické. Polymerní hydrofobicitu, teplota tání, teplota skelného přechodu a stupeň krystalinity zcela závisí na monomerním složení [28, 38].

Biopolymery s krátkým řetězcem jsou tuhé, křehké a mají vysoký stupeň krystalinity v rozmezí od 60 do 80 %. Na druhou stranu, biopolymery se středně dlouhým řetězcem jsou pružné, elastické a mají nízkou krystalinitu (25 %), nízkou pevnost v tahu a nízkou teplotu tání [39–40].

Poly(3-hydroxybutyrát) je vysoce krystalický především díky jeho stereoregularitě. Jeho teplota tání je 180 °C, je velmi křehký a tuhý. P(3HB) je ve vodě nerozpustný polymer a je relativně odolný vůči hydrolytické degradaci. Má nízkou propustnost kyslíku a dobré termoplastické vlastnosti. Tento polymer má horší mechanické vlastnosti, jako například Youngův modul a pevnost v tahu, než syntetické polymery, mezi které patří polypropylen. Hustota krystalického a amorfního PHB je 1,26 a 1,18 g/cm³. Jeho molekulová hmotnost se obvykle pohybuje v rozmezí od 10 000–3 000 000 Da s polydisperzitou kolem 2. P(3HB) je biokompatibilní, opticky čistý a disponuje piezoelektrickými vlastnostmi. Vlastnosti P(3HB) mohou být vylepšeny zavedením různých HA monomerů do řetězce. Do řetězce je možnost zavést například poly(3-hydroxyvalerát) (P(3HV)) či 3-hydroxyhexanoát (3HHx) [38, 40–41].

Poly(4-hydroxybutyrát) je silný a poddajný termoplastický materiál s pevností v tahu téměř srovnatelnou s pevností v tahu polyethylenu. P(4HB) má prodloužení při přetržení 1 000 %, což vede k mimořádně elastickým vlastnostem. Jeho materiálové vlastnosti se můžou měnit, a to tehdy, když se tento biopolymer kombinuje s jinými hydroxykyselinami, jako tomu je i u poly(3-hydroxybutyrátu). Jedná se o polyester, který je v současné době vyvíjen jako nový vstřebatelný biomateriál pro lékařské aplikace. Využití je zejména pro výrobu textilních produktů, jako například záplat, štepů, lešení u tkáňového inženýrství, šňůr a chirurgických sítěk. Několik příkladů textilních struktur vyrobených z P(4HB) vláken je uvedeno na Obr. 6 [38, 41–43].



Obr. 6: Textilní struktury vyrobené z P(4HB) [43]

Běžně se pro vznik kopolymerů využívá inkorporace různých HA, jako například 3-hydroxyvalerátu, 3-hydroxyhexanoátu, 3-hydroxypropionátu a 4-hydroxybutyrátu, do polymerního řetězce. Tímto postupem se výrazně zlepšují materiálové vlastnosti P(3HB), jako například krystalizace, bod tání, tuhost a houževnatost. P(3HB-co-3HV), což je nejvíce známý kopolymer, má nižší krystalinitu, nižší teplotu tání, nižší tuhost, zvýšené prodloužení při přetržení, je pružnější (klesá Youngův modul) a je tvrdší (zvyšuje se houževnatost) než P(3HB) [41].

Molární procento P(3HV) je velmi důležité při stanovení vlastností kopolymeru. Termomechanické vlastnosti se mohou široce měnit, protože složení P(3HB-co-3HV) se může pohybovat od 0 do 30 molárních procent P(3HV). Například P(3HB-co-3HV) obsahuje více než 20 molárních procent 3HV jednotek a může být použit k výrobě filmů a vláken s různou elasticitou. P(3HB-co-3HV) kombinuje termomechanické vlastnosti polyethylenu (pevnost, pružnost, tažnost, houževnatost, elasticitu) s chemickými vlastnostmi polyesterů (potiskovatelnost, barvitelnost) [41, 44–45].

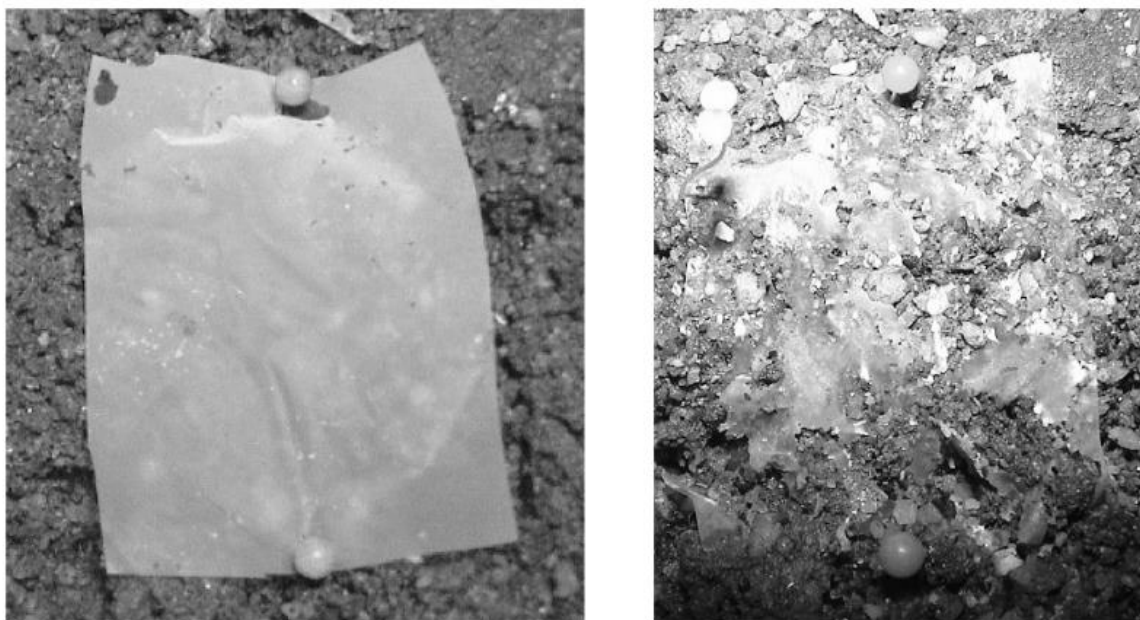
Materiální vlastnosti P(4HB) jsou velmi pestré. Materiální vlastnosti P(3HB), P(3HB-co-3HV) a P(4HB) jsou shrnuty v Tabulka č. 4 [38].

Tabulka č. 4: Materiální vlastnosti některých polyhydroxyalkanoátů [38]

Vlastnosti	P(3HB)	P(3HB-co-3HV)	P(4HB)
Teplota tání [°C]	177	150	60
Teplota skelného přechodu [°C]	4	-7,25	-50
Pevnost v tahu [MPa]	40	25	104
Prodloužení při přetržení [%]	6	20	1000

2.5.4 Biologická rozložitelnost polyhydroxyalkanoátů

Základní vlastnost, která odlišuje polyhydroxyalkanoáty od syntetických plastů je jejich biologická rozložitelnost. Degradace PHA probíhá při jejich zanesení do půdy, kompostu či mořského sedimentu. Biodegradace je závislá na celé řadě faktorů, jako je například mikrobiální aktivita životního prostředí, vlhkost, teplota, pH a molekulová hmotnost. Pro PHA je důležitá i polymerní kompozice, složení a krystalinita. Tyto bioplasty nevyžadují speciální podmínky a degradují v aerobním i anaerobním prostředí díky tepelné degradaci či enzymatické hydrolýze, což je jedna z hlavních výhod. V porovnání s polylaktidy jsou PHA lépe rozložitelné a jejich degradaci je možno vidět na Obr. 7. Polyhydroxyalkanoáty jsou obnovitelné povahy, a tudíž mohou být vyrobeny z obnovitelných zdrojů, mezi které patří například rostlinné oleje (ricinový, sójový, řepkový), sacharidy (pšenice, kukuřice, brambory, cukrová třtina a jiné) nebo dokonce oxid uhličitý [34, 39, 46–50].



Obr. 7: Degradace vrstvy PHA umístěné na povrchu půdy v tropických podmínkách. Vrstva zcela zmizela za méně než 50 dní [48]

Degradaci také ovlivňují monomerní jednotky. Kopolymery obsahující P(3HB) monomerní jednotky degradují mnohem rychleji než samotný polyhydroxybutyrát či P(3HB-co-3HV) kopolymery. Mikroorganismy vylučují enzymy, které odbourávají polymer na jeho molekulové stavební bloky, nazývané hydroxykyseliny, které jsou využívány jako zdroj uhlíku pro růst a metabolismus. Základní enzym pro degradaci PHB a oligomerů je PHB depolymeráza. PHA jsou kompostovatelné v širokém rozmezí teplot, avšak maximálně při teplotě 60 °C a vlhkosti 55 %. Studie ukázaly, že až 85 % polyhydroxyalkanoátů je degradováno do sedmi týdnů. Bylo prokázáno, že existují i PHA degradovatelné ve vodním prostředí, konkrétně v jezeře Lugano ve Švýcarsku. Zde se rozloží do 254 dnů, a to při teplotách nepřesahujících 6 °C [39, 46].

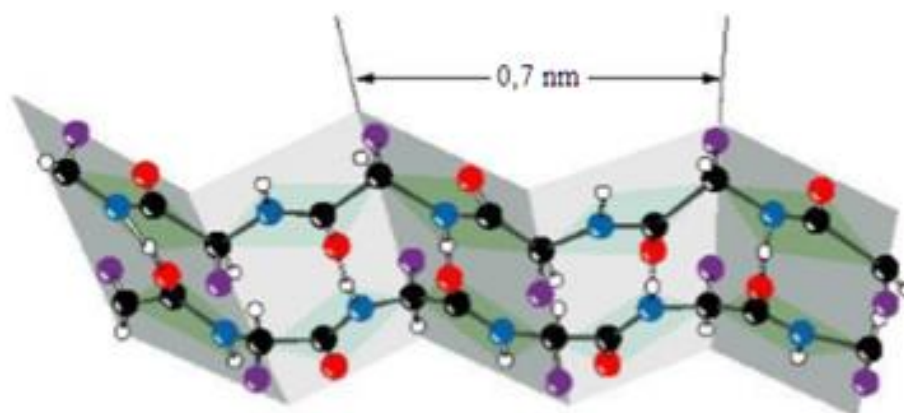
S nízkou molekulovou hmotností jsou PHA náchylnější k biologickému rozkladu a teplota tání je důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu při studiu biodegradace. Se zvyšujícím se bodem tání se snižuje biologická rozložitelnost. Navíc, s rostoucí teplotou tání klesá enzymatická rozložitelnost. Mochizuki a Hiramí (1995) vysvětlili, že biologický rozklad pevných polymerů je ovlivněn chemickou strukturou (zejména funkčními skupinami) a vysoce uspořádanými strukturami (hlavně krystalinitou, orientací a morfologickými vlastnostmi). Tokiwa (1992) zase se spolupracovníky potvrdil, že krystalinita hraje velmi důležitou roli v biologické rozložitelnosti. Kromě toho také teplota a mikrobiální populace v daném prostředí rovněž přispívá k biologické rozložitelnosti [38].

2.6 Biodegradace odpadního peří

V drůbežářství se každoročně likvidují miliony tun odpadu z peří i přesto, že obsahují velké množství hodnotného keratinu. Produkty drůbežářského průmyslu představují v lidské stravě důležitý zdroj bílkoviny. Průmysl však produkuje také obrovské množství odpadu, což je potřeba řešit. Jeden z hlavních odpadních produktů je peří, které představuje 5–10 % hmotnosti dospělého kuřete. Množství kuřecího peří vytvořeného v drůbežářském průmyslu je kolem 5 000 000 tun ročně. Mezi klasické metody likvidace peří patří spalování nebo skládkování, což zahrnuje především náklady a je zde riziko kontaminace vzduchu, půdy a vody. Tyto metody již byly omezeny a v některých zemích dokonce zakázány, především díky znečištění, které způsobují. V dnešní době roste potřeba vývoje nových technologií zpracování peří, které by byly šetrné k životnímu prostředí. V ideálním případě by se vedlejší produkty z odpadu peří mohly hodnotně využívat [51–52].

Peří obsahuje více než 90 % proteinu keratinu, který je bohatý na cystein, arginin, threonin, hydrofobní aminokyseliny a má vysoký potenciál živin. Keratin z peří by mohl být použit jako alternativa k dražším potravinovým přísadám, které jsou používány v krmivech pro zvířata, hnojivech a krmných doplncích. Nicméně vzhledem k pevné konstrukci keratinu, ve kterém jsou proteinové řetězce pevně sbaleny a stabilizovány pomocí hydrofobních interakcí a disulfidových vazeb, degradace pomocí běžných proteolytických enzymů jako je pepsin, papain nebo trypsin není možná. Použití peří jako krmiva je poněkud nákladný proces, ve kterém se peří musí sterilizovat a převést na materiál stravitelnější většími zvířaty. Často je nákladově efektivnější, aby se peří rozkládalo přirozeně. Nicméně, normální půdní mikroby si neporadí s množstvím peří, které je produkováno v drůbežářství. Keratinolytické enzymy

mohou mít potenciální roli v biologických průmyslových procesech, které zahrnují keratin v odpadech z drůbeže a kožedělného průmyslu. [51, 53–54].



Obr. 8: Struktura β -keratinu [55]

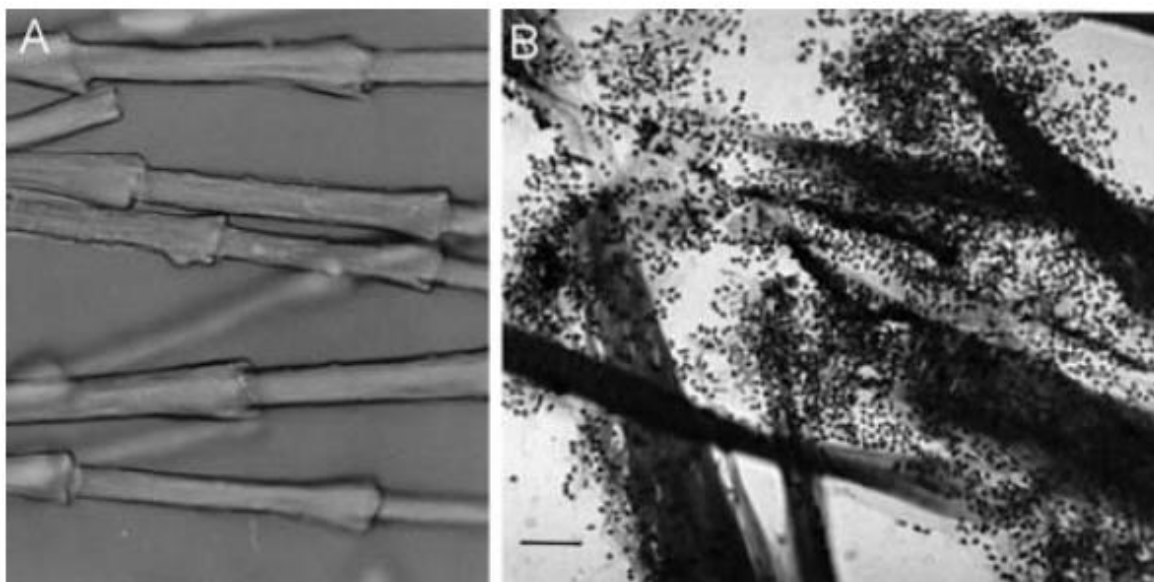
Dnes jsou již známy kmeny, které jsou schopny degradovat peří. Tyto bakteriální kmeny produkují enzymy, které selektivně degradují β -keratin (Obr. 8) nacházející se v peří. Zmíněné enzymy umožňují bakteriím získat uhlík, síru a energii pro jejich růst. Enzym, který degraduje keratin se nazývá keratináza a má keratinolytickou aktivitu. β -keratináza je enzym schopný degradovat β -keratin. Keratinázy jsou z bakterií izolovány a charakterizovány. Mohou být izolovány z bakterií *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Microbacterium sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Streptomyces sp.*. Keratinázu v roce 1878 izoloval Kuhne a v roce 1883 ji analyzoval vědec Pesox [52, 56–57].

V podstatě můžeme keratin najít ve vlasech, savčích kopytech, rozích, drápech. β -keratin je zase přítomen v nehtech, šupinách a drápech plazů. Keratin je nerozpustný ve vodě, vodných roztocích neutrální soli, organických rozpouštědlech a je relativně odolný proti degradaci. Známé keratinázy jsou především produkovány mezofilními houbami a aktinomycetami, avšak některé teplomilné druhy bakterie *Bacillus* produkují enzymy degradující peří. Bylo popsáno, že použití keratináz vylepšuje nutriční hodnotu peří [52, 58].

Govarthanan a spol. (2010) se zabývali keratinolytickou bakterií izolovanou z kuřecího fekálního odpadu, zaměřili se především na enzymatickou aktivitu. Keratinázovou aktivitu testovali s pomocí keratinazuru, který byl použit jako substrát. Reakční směs obsahovala 1 ml keratinazurové suspenze a 1 ml vhodně zředěného enzymu. Reakce byly prováděny při 50 °C a při konstantním míchání 200 otáček za minutu po dobu 60 minut. Po inkubaci byla reakce zastavena přidávkem 2 ml 0,4 mol/l trichloroctové kyseliny. Membránovou filtrací byl odstraněn substrát a filtrát byl změřen kolorimetricky při 595 nm. Ve své studii zjistili, že keratinolytické kmeny mohou být použity k výrobě proteinových krmiv pro ryby a že několik izolátů bylo schopno růst a vykazovat keratinolytickou aktivitu [53].

Cílem studie Riffela a spol. (2003) bylo identifikovat nové keratinolytické bakterie, které vykazují vysokou degradaci peří při laboratorní teplotě, s potenciálním využitím v biotechnologických procesech. Degradaci peří pomocí keratinolytické bakterie je možno

vidět na Obr. 9. Tyto mikroorganismy jsou méně energeticky náročné než termofilní kmeny, které se obvykle používají při zpracování peří. Tato skupinka izolovala mezofilní bakterie degradující peří z průmyslového drůbežího odpadu. Mikroorganismus *Chryseobacterium kr6* prokázal výrazný růst v médiu s peřím. Tento izolát byl tedy vybrán pro identifikaci a také k rozkladu peří [59].



Obr. 9: Degradace peří pomocí keratinolytické bakterie. Přírodní peří bylo autoklávováno a inkubováno při 30 °C po dobu 3 dnů v **A** nepřítomnosti nebo **B** přítomnosti kmene *kr6* [59]

Sivakumar a jeho tým studovali bakterii *B.subtilis*, která rostla na peří v minerálním médiu. Po týdenní kultivaci při 37 °C bylo dosaženo téměř kompletní degradace peří. Koncentrace rozpustného proteinu uvolněného do média se postupně zvyšovala a po 7.dnu inkubace, kdy dosáhla svého maxima, začala klesat. Podobný průběh byl sledován u volných aminokyselin, avšak ty dosáhly svého maxima již třetí den kultivace. Bakterie *B.subtilis* pěstovaná na peří totiž vylučovala keratinázy, které hydrolyzují β -keratin a tím uvolňují oligopeptidy a aminokyseliny do média. Dalším významným sledovaným faktorem během této fermentace byla změna koncentrace vodíkových iontů. Bylo zjištěno, že se hodnota pH zvýšila z hodnoty 6,8 až na hodnotu 8,44. Sedmý den byla naměřena i nejvyšší keratinázová aktivita (35,3 U/ml), což odpovídá nárůstu koncentrace proteinu v médiu [60].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1 Použité bakteriální kmeny

K práci byly použity bakterie izolované z půdy zamořené ropou a to *Pseudomonas gessardii* a *Pseudomonas fulva* od společnosti Dekonta, Brno, Česká republika. Dále byl použit kmen *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125), který byl získán z německé sbírky Leibniz Institute DSMZ-German of Microorganisms and Cell Cultures.

3.1.2 Chemikálie pro kultivaci mikroorganismů

NutrientBroth (Himedia)

Agar Powder (Himedia)

3.1.3 Ostatní chemikálie

Azokasein (Sigma-Aldrich)

Triton X (AppliChem; BioChemica)

Chlorid draselný (Lach-Ner)

Azoalbumin (Sigma-Aldrich)

Keratinazur (Sigma-Aldrich)

Kyselina oktanová (Sigma-Aldrich)

Trichloroctová kyselina (Lach-Ner)

Hydroxid sodný (Lach-Ner)

Chlorid sodný (Lach-Ner)

Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Lach-Ner)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-Ner)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)

Síran amonný (Lach-Ner)

Fosforečnan disodný (Lach-Ner)

Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner)

Kopolymer P(3HB) (Fluka)

Chlorid vápenatý (Lach-Ner)

Chlorid železitý (Lach-Ner)

Síran měďnatý (Lach-Ner)

Chlorid kobaltnatý (Lach-Ner)

Chlorid nikelnatý (Lach-Ner)

Kyselina sírová (96%) p.a (Lach-Ner)

Kyselina benzoová (Lach-Ner)

Chloroform (Lach-Ner)

Ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a byly získány od standardních dodavatelů.

3.1.4 Přístroje

Plynový chromatograf: GC-FID detektor (Trace GC Ultra, Thermo)

Kolona – DB-WAX 30 m by 0,25 mm

Thermo Software Xcalibur

Předvážky, Kern EW 620-3NM

Analytické váhy, Boeco (Německo)

Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA)

Centrifuga, Sigma (Sartorius)

Centrifuga, Sigma Laborzentrifugen 3-15

Centrifuga, Boeco U-32R (Německo)

Temperovaná třepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o (ČR)

Termostat, Biotech Julabo TW2

Termostat blokový, Stuart SBH 200D

Spektrofotometr, Biotech (Implen)

Vortex, TK3S, Tecno Kartell (USA)

Inkubátor, Biotech IP60

Analyzátor EA3000 (Eurovector)

Běžné laboratorní sklo a vybavení.

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Uchování bakteriálních kultur a příprava inokula

Jedním z prvních úkolů bylo oživit kultury v lyofilizovaném stavu. Kultury byly oživeny a kultivovány na pevném médiu Nutrient Broth při teplotě 30 °C. Bakterie byly po kultivaci uchovány při 4 °C případně ve formě kryokonzervy při –80 °C. Bakterie od společnosti Dekonta byly dodány na Petriho miskách, byly pravidelně přeočkovávány na nové Petriho misky a taktéž dlouhodobě uchovány ve formě kryokonzerv.

Inokulum pro kultivaci bylo připravováno ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách, které obsahovaly 50 ml média. Toto inokulum bylo třikrát zaočkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny. Následně bylo inokulum inkubováno 24 hodin na temperované třepačce při frekvenci 180 rpm a teplotě 30 °C. Poté bylo připravené inokulum používáno pro zaočkování produkčního minerálního média. Do minerálního média bylo přidáváno 5 % inokula vzhledem k celkovému objemu média.

3.2.2 Živná média

Pro uchování kultury bylo použito pevné agarové médium NutrientBroth.

Složení NutrientBroth:

Beef extract	10 g·l ⁻¹
Pepton	10 g·l ⁻¹
NaCl	5 g·l ⁻¹
Agar	20 g·l ⁻¹

Pro přípravu inokula bylo použito:

NutrientBroth	25 g·l ⁻¹
Destilovaná voda	1000 ml

Minerální médium pro degradaci peří:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
Peří	20 g
Roztok stopových prvků*	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Produkční minerální médium pro kultivaci kmenů *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas putida* mělo následující složení:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 nebo 0 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
Kyselina oktanová	2 g
Rostlinný olej	20 g
Roztok stopových prvků*	1 ml
Destilovaná voda	1000 ml

*Složení roztoku stopových prvků:

CaCl ₂	7,8 g
FeCl ₃	9,7 g
CuSO ₄	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
Destilovaná voda	1000 ml

Všechna živná média s promytým peřím byla před použitím vysterilizována. Po sterilaci a vychladnutí médií na laboratorní teplotu byl v očkovacím boxu přidán roztok stopových prvků. Dále bylo v očkovacím boxu do Erlenmeyerových baněk se sterilním produkčním minerálním médiem přidáno 5 % z narostlých kultur.

3.3 Růstová křivka

V rámci této studie bylo po dobu jednoho týdne měřeno pH, zákal, biomasa, obsah PHA a degradace peří.

3.3.1 Inokulum

Růstová křivka byla stanovována u všech tří kmenů, tedy u kmenů *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas putida*. Kultivace inokul v NB médiu probíhala při

frekvenci 180 rpm, 30 °C a po dobu 24 hodin. Toto inokulum bylo použito k zaočkování produkčního média.

3.3.2 Minerální médium

Růstová křivka byla stanovována po dobu sedmi dnů. Na každý den byla připravena jedna Erlenmayerova baňka pro každý kmen. Do každé Erlenmayerovi baňky o objemu 250 ml bylo připraveno 100 ml minerálního média a bylo přidáno 20 g/l promytého a vysušeného peří. Poté byly baňky s médií a peřím vysterylizovány. Po vychladnutí bylo v očkovacím boxu do médií přidáno 5 obj. % inokula a 0,1 ml stopových prvků.

3.3.3 Stanovení biomasy

Z každé kultury bylo pro stanovení biomasy odebráno 2x 10 ml z každé kultury do centrifugačních zkumavek, ty byly stočeny (7000 rpm, 5 min) a supernatant byl slit. Následně byla biomasa rozsuspendována v 5 ml destilované vody, stočena při stejných podmínkách a supernatant byl opětovně slit. Takto připravená biomasa byla sušena v sušárně při teplotě 75 °C do konstantní hmotnosti. Průměrem dvou odebraných vzorků bylo určeno výsledné množství biomasy.

3.3.4 Stanovení obsahu PHA

Stanovení obsahu PHA bylo prováděno pomocí plynového chromatografu s FID (flame ionization detector – plamenově ionizační detektor). V podstatě jde o převedení polyhydroxyalkanoátů na těkavé methylestery za pomoci kyselých katalyzovaných esterifikací.

3.3.4.1 Stanovení kalibrační křivky

Do předem připravené vialky bylo naváženo přesné množství komerčně dostupného kopolymeru a k němu byly přidány 4 ml chloroformu. Vialka se standardem byla zahřívána při 70 °C až do úplného rozpuštění granulátu čili zhruba 20 minut. Po vychladnutí byl tento standard pipetován v množstvích 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml do předem připravených vialek. Postupně k nim byl přidán chloroform na výsledný objem 1 ml a následně bylo do každé vialky napipetováno 0,8 ml 15 % roztoku kyseliny sírové v methanolu (vnitřní standard). Vialky byly řádně zazátkovány, popsány a poté byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány při 94 °C 3 hodiny. Po skončení inkubace byly vialky ochlazeny na laboratorní teplotu a obsah vialky byl extrahován 0,5 ml 0,5M NaOH. Směs byla protřepána a po oddělení fází bylo 50 µl spodní chloroformové části odpipetováno a přeneseno do nových vialek. K odebrané spodní chloroformové části bylo přidáno 950 µl chloroformu, vialky byly uzavřeny a následně měřeny.

3.3.4.2 Stanovení PHA v biomase

Do krimpovacích vialek bylo přidáno potřebné množství biomasy (okolo 10 mg biomasy), dále 1 ml chloroformu a 0,8 ml 15 % kyseliny sírové v methanolu. Díky přidání 15 % kyseliny sírové v methanolu se polymery naštěpí a vzniklé 3-hydroxykyseliny se převedou na více těkavé methylestery. Vialky byly řádně zazátkovány, byly vloženy do termostatu a zde byly inkubovány při 94 °C 3 hodiny.

Po uplynutí doby inkubace bylo do větších vialek napipetováno 0,5 ml 0,05 M NaOH a do těchto vialek byl vylit obsah vzorků z termostatu, poté co vychladly na laboratorní teplotu. Směs byla protřepána a po oddělení fází bylo 50 µl spodní chloroformové části a 950 µl chloroformu převedeno do nových vialek. Takto připravené vialky se vzorky byly měřeny na plynovém chromatografu.

3.3.5 Stanovení hodnoty pH

Po dobu sedmi dní byla měřena hodnota pH v kulturách pomocí pH metru. Každá kultura byla proměřena 3x a zprůměrované výsledky byly zpracovány do grafu.

3.3.6 Degradace peří

Po dobu sedmi dní byl stanovován úbytek peří. Kmeny byly kultivovány spolu s peřím (20 g/l) na minerálním médiu. Každý den byla jedna Erlenmayerova baňka přefiltrována pomocí vodní vakuové filtrace a po vysušení byl spočítán úbytek peří.

3.3.7 Prvková analýza

Prvková analýza byla provedena na elementárním analyzátoru EA 3000, kde jednotlivé plynné složky generované ve spalovacím reaktoru jsou separovány za pomoci principu plynové chromatografie a následně jsou detekovány vysoce citlivým teplotně vodivostním detektorem (TCD). Tato analýza byla provedena s promytým a vysušeným peřím a taky s peřím, které podlehlo degradaci pomocí mikroorganismů. Byly stanoveny prvky C, H, N a S, obsah O byl stanoven dopočítáním.

3.3.8 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Pro infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) byly kmeny spolu s peřím kultivovány v tekutém minerálním médiu. Po sedmi denní kultivaci (30 °C, 180 rpm) byl obsah baňky přefiltrován vodní vakuovou filtrací a jako filtr byl použit filtrační papír. Částice menší, než póry filtru prochází skrze filtr, zatímco větší částice zůstávají na jeho povrchu a vytvoří filtrační koláč. Filtrační papír spolu s jeho obsahem byl sušen v sušárně při teplotě 75 °C do kompletního vysušení a takto připravený vzorek byl měřen pomocí infračervené spektroskopie (Nicolet iS50), metodou úplného zeslabeného odrazu (jednoodrazový diamantový ATR nástavec).

3.3.9 Stanovení proteázové aktivity

Pro stanovení proteázové aktivity byl použit azokasein a pro porovnání i roztok azoalbuminu, což je chemicky modifikovaný protein albuminu s navázanou sulfanilamidovou skupinou. Principem stanovení proteázové aktivity je enzymové štěpení azokaseinu na azooligopeptidy. Barevné peptidy jsou uvolňovány enzymatickou hydrolýzou a jsou rozpustné v trichloroctové kyselině. Tyto peptidy jsou následně detekovány při 440 nm. Jednotka aktivity je pak charakterizována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu za podmínek testu [61–62].

Z každé kultivační baňky byly odebrány 2 ml do centrifugačních zkumavek, které byly stočeny (7000 rpm, 5 min, laboratorní teplota) a supernatant byl poté dále použit pro stanovení

proteázové aktivity. Následně bylo 100 µl roztoku azokaseinu o koncentraci 5 mg/ml smícháno s 100 µl supernantu obsahujícího enzym a vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 60 minut. Reakce byla zastavena přidáním 410 µl 10 % kyseliny trichloroctové a vzorky byly zcentrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 2 minut. Před měřením absorbance bylo v kyvetě k 500 µl supernatantu přidáno 700 µl 1 M NaOH. Poté byla změřena absorbance při 440 nm proti blanku. Příprava blanku probíhala stejně jako u vzorků, avšak reakce byla zastavena kyselinou trichloroctovou ještě před inkubací.

3.3.10 Stanovení keratináz pomocí keratinazuru

Nejprve probíhala optimalizace metody. Z každé kultivační baňky bylo odebráno 5 ml do centrifugačních zkumavek, které byly stočeny (7000 rpm, 5 min, laboratorní teplota) a jejich supernatant byl poté dále použit pro stanovení keratinázové aktivity. Jako substrát byl používán keratinazur, který byl nejprve zmrazen pomocí kapalného dusíku a poté pomocí misky s tloučkem rozdrcen na prášek. 5 mg tohoto prášku bylo rozsuspendováno v 1 ml 50 mmol/L fosfátového pufru* o hodnotě pH 7,5 a k této směsi bylo přidáno 0,5 ml supernatantu obsahujícího enzym. Blank byl připravován stejně, avšak namísto supernatantu byla použita voda. Takto připravené směsi byly inkubovány a třepány (při rychlosti 200 otáček za minutu) při 37 °C přesně 2 hodiny. Po inkubaci byly reakce stopnuty pomocí přidavku 2 ml 0,4 mol/l trichloroctové kyseliny a zcentrifugovány (11600 rpm, 5 min, laboratorní teplota). Následně byla změřena absorbance při 595 nm proti blanku.

*Složení fosfátového pufru:

NaCl	8,0062 g
KCl	0,2013 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,7804 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,2902 g

K těmto naváženým chemikáliím bylo přidáno 800 ml destilované vody, pH bylo pomocí 1M HCl upraveno na hodnotu 7,5 a poté byl objem doplněn destilovanou vodou na 1 litr.

3.4 Produkce PHA

Další z experimentů byla kultivace všech mikroorganismů na oleji. Nejprve byla provedena kultivace těchto mikroorganismů na minerálním médiu s peřím, která trvala čtyři dny. Poté byly připraveny tři Erlenmayerovi baňky s produkčním minerálním médiem (složení viz výše) a tři baňky s produkčním minerálním médiem bez síranu amonného. Důvod nepřidání síranu amonného byla limitace dusíkem, což by v našem případě mohlo podpořit mikroorganismy k větší produkci polyhydroxyalkanoátů. Média byla vysterilizována a zaočkována 10 ml z kultur s peřím. Do každé baňky byl přidán roztok stopových prvků (1 ml/l) a rostlinný olej (20 g/l). Baňky byly kultivovány při 180 rpm a teplotě 30°C.

Po jednom dnu kultivace byla ke kulturám přidána kyselina oktanová, tak aby její výsledná koncentrace činila 2 g/l. Poté bylo pravidelně každý den odebíráno do centrifugačních zkumavek potřebné množství z kultur pro porovnání biomasy, hodnoty a pro stanovení polyhydroxyalkanoátů. Zkumavky byly stočeny (7000 rpm, 5 min, 4 °C), supernant byl slit

a biomasa byla rozsuspendována v 5 ml 5 % tritonu. Zkumavky s biomasou byly opět stočeny, slity a biomasa byla rozsuspendována v 5 ml destilované vody. Takto připravené zkumavky byly opět stočeny, slity a následně sušeny v sušárně při 75 °C do konstantní hmotnosti. Vysušená biomasa byla zvážena a použita pro stanovení obsahu PHA na plynovém chromatografu (postup přípravy viz výše).

3.5 Biodegradace ropných uhlovodíků

Byla připravena inokula pro kmeny *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas fulva* a *Pseudomonas putida*. Na druhý den bylo připraveno 9x 250 ml minerálního média do baněk o objemu 500 ml. Po sterilizaci byl do baněk přidán roztok stopových prvků (1 ml/l), nafta a baňky byly zaočkovány 5 % z připraveného inokula. Pro každou kulturu byly připraveny tři koncentrace nafty, konkrétně 1 g/l, 3 g/l a 5 g/l. Všechny baňky byly kultivovány při 30 °C a 180 rpm po dobu jednoho týdne.

Každý den kultivace bylo z každé kultivační baňky odebráno 3x 10 ml pro stanovení zákalu, pH a obsahu biomasy. Dvě centrifugační zkumavky byly stočeny a promyty stejně jako v předchozím případě, tedy 5 % tritonem a vodou. Na konci experimentu byl opět stanoven obsah polyhydroxyalkanoátů v biomase na plynovém chromatografu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část byla zaměřena na posouzení vlivu schopnosti akumulace polyhydroxyalkanoátů na bioremediční proces. Valná část experimentů byla věnována studiu biodegradace odpadního peří pomocí mikrobiálních kmenů. S vybranými kmeny byla stanovována degradace peří, enzymatická aktivita, zapojení produkce jak na oleji, tak na kyselině oktanové. Námi vybrané kmeny byly: *Pseudomonas putida* (PP) – mikroorganismus, který se vyskytuje na peří a dva izoláty z půdy zamořené ropou – *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3).

4.1 Výsledky růstové křivky

Růstovou křivku je možno vyjádřit jako růst počtu buněk v závislosti na době kultivace a lze ji vyjádřit graficky. Na křivce se vymezují úseky tzv. růstové fáze. Růstová křivka má typický tvar písmene S a rozlišujeme u ní 4 růstové fáze: lag-fázi, exponenciální fázi, stacionární fázi a fázi odumírání. Rychlost růstu závisí na podmínkách růstu (pH, teplota, množství kyslíku a jiné) a taky na použité bakterii.

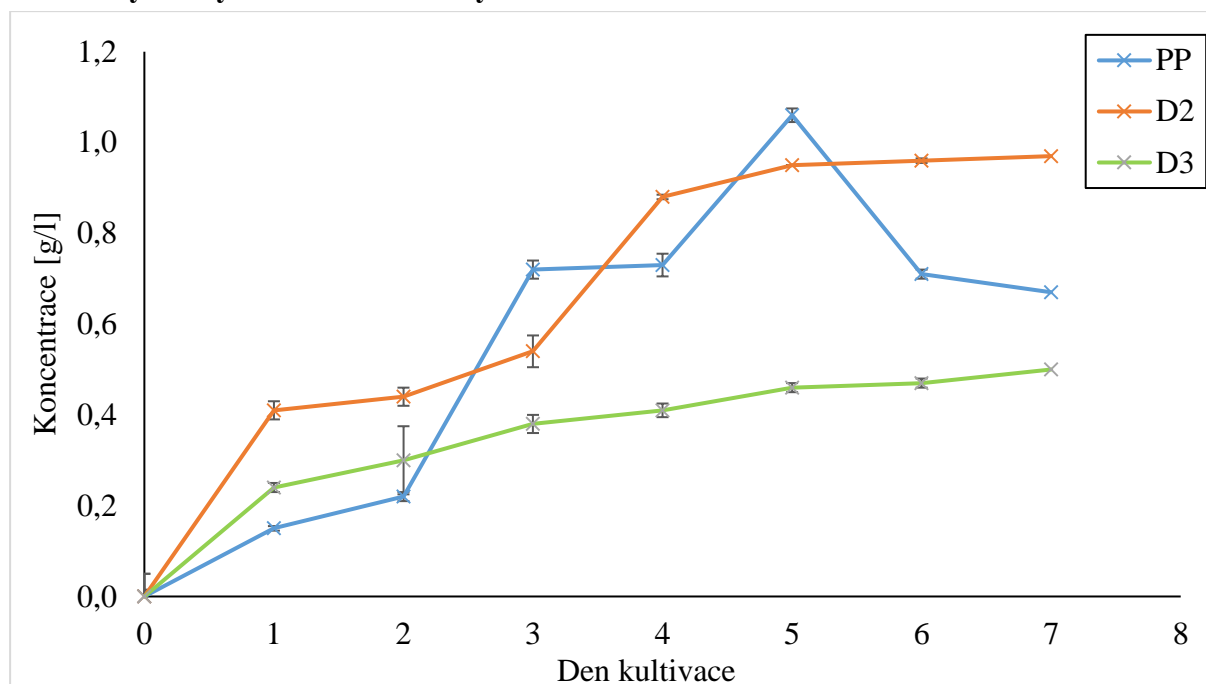
Kmeny byly po dobu jednoho týdne kultivovány při stejných podmínkách (viz Tabulka č. 5). Z růstové křivky lze zjistit, kdy je nárůst buněk nejvyšší. Bylo potřeba sledovat průběh růstu koncentrace biomasy kvůli pozdější produkci PHA. V průběhu jednoho týdne bylo každý den měřeno pH, obsah biomasy, obsah polyhydroxyalkanoátů, degradace peří a také byla stanovena proteázová a keratinázová aktivita.

U všech mikroorganismů probíhala tzv. vsádková kultivace, která se vyznačuje tím, že všechny živiny i inokulum jsou přivedeny na začátku kultivace. Jedná se tedy o uzavřený systém, kde jsou průběžně spotřebovávány živiny. Při této kultivaci se hromadí biomasa a metabolity díky činnosti mikroorganismů (tyto odpadní produkty se v průběhu kultivace nijak neodstraňují).

Tabulka č. 5: Podmínky pro růst mikroorganismů

Název kmene	Označení	Teplota [°C]	Míchání [min ⁻¹]
<i>Pseudomonas putida</i>	PP	30 °C	180
<i>Pseudomonas gessardii</i>	D2		
<i>Pseudomonas fulva</i>	D3		

4.1.1 Výsledky stanovení biomasy a obsahu PHA



Obr. 10: Závislost koncentrace biomasy na čase kultivace u kmenů *Pseudomonas gessardii* (D2), *Pseudomonas fulva* (D3) a *Pseudomonas putida* (PP); hodnoty byly získány z průměrovaných naměřených hodnot; chybové úsečky jsou vypočítány pomocí funkce SMODCH

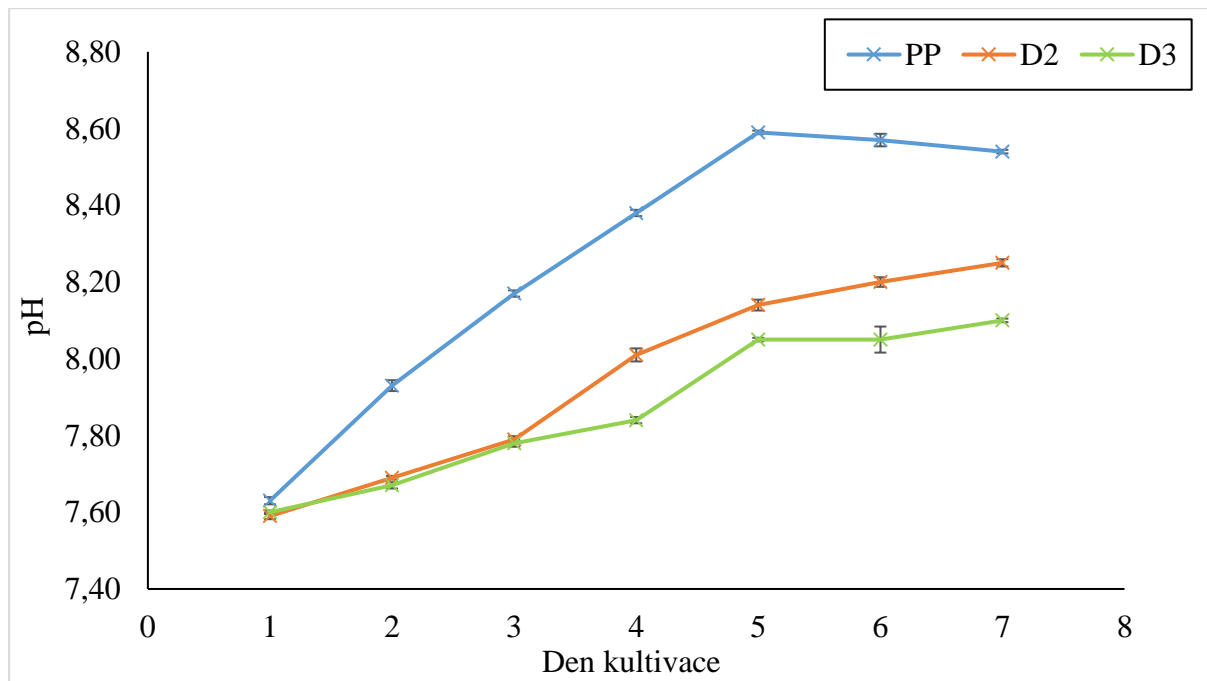
Změnu koncentrace biomasy v průběhu kultivace znázorňuje Obr. 10. Průběh růstové křivky bakterie *Pseudomonas gessardii* (D2) má typický sigmoidní tvar a lze pozorovat tři základní fáze růstu (lag-lázi, fázi exponenciálního růstu a stacionární fázi). Exponenciální nárůst buněk nastal mezi třetím a čtvrtým dnem kultivace. Od pátého dne začala stacionární fáze a koncentrace biomasy zůstala téměř neměnná. Podobný průběh lze pozorovat také u bakterie *Pseudomonas putida* (PP). I tato křivka vykazuje sigmoidní tvar, avšak již druhý den dochází k exponenciálnímu nárůstu buněk. Pátý den kultivace byla koncentrace biomasy nejvyšší a to 1,06g/l. Růstová křivka bakterie *Pseudomonas fulva* (D3) měla zcela jiný průběh. Během celé kultivace obsah koncentrace biomasy pomalu vzrůstal, typické růstové fáze zde nejsou zřejmé. Zde by stálo za zváženou prodloužit dobu kultivace.

Biomasa byla otestována na přítomnost polyhydroxyalkanoátů, nicméně obsah polymeru nebyl v biomase detekován. Tato skutečnost není překvapivá, protože buňky byly kultivovány na substrátu bohatém na obsah dusíku, přičemž limitace dusíkem je nejdůležitějším faktorem indukujícím biosyntézu PHA. Při kultivaci na odpadním peří tedy k akumulaci PHA ani docházet nemůže.

4.1.2 Stanovení hodnoty pH v průběhu růstu na odpadním peří

Růst mikroorganismů i degradace peří závisí na hodnotě pH. Hodnota pH byla stanovována během celého experimentu, aby bylo objasněno, jestli se pH v průběhu týdenní kultivace nějak razantně mění nebo nemění. Hodnotu pH bylo velmi důležité měřit, protože s pH souvisí řada faktorů, například produkce a aktivita enzymů, která se podílí na degradaci peří. Zároveň je pH parametrem, který může hodně napovědět o metabolických procesech mikroorganismů, a proto

je tento vývoj jedním z monitorovaných parametrů při standardním biotechnologickém procesu. Průběh změn pH znázorňuje Obr. 11.



Obr. 11: Závislost hodnoty pH na čase kultivace

U bakterie *Pseudomonas putida* je v průběhu kultivace patrný nárůst hodnoty pH, která se pátý den kultivace vyšplhala až na hodnotu 8,59. Nárůst hodnoty pH, který byl pozorován u všech kmenů a je typický pro kultivace, kde je jako primární zdroj uhlíku využíván protein, anebo jiná látka bohatá na dusík. Produkty deaminace (obvykle NH_3 , případně aminy) jsou obvykle mikroorganismy exkretovány do kultivačního média, kde navyšují pH. Pátý den kultivace také byla nejvyšší hodnota koncentrace biomasy. Je možné, že jedním z faktorů, který zastavil růst bakteriální kultury, byla příliš vysoká hodnota pH. Při reálném procesu biologické eliminace peří by proto bylo vhodné regulovat hodnotu pH přidavkem kyseliny na hodnotu blízkou počátečnímu pH kultivace. U bakterie *Pseudomonas gessardii* a *Pseudomonas fulva* je první tři dny kultivace hodnota pH téměř srovnatelná. V dalších dnech kultivace tato hodnota stále vzrůstá. U těchto dvou bakterií nedochází k poklesu pH ani k poklesu koncentrace biomasy. Nejvyšší rychlost nárůstu pH u bakterie *Pseudomonas putida* je možné interpretovat jako marker vysoké degradační aktivity tohoto kmene vůči peří, což nám potvrdily i následující experimenty.

4.1.3 Výsledky degradace peří

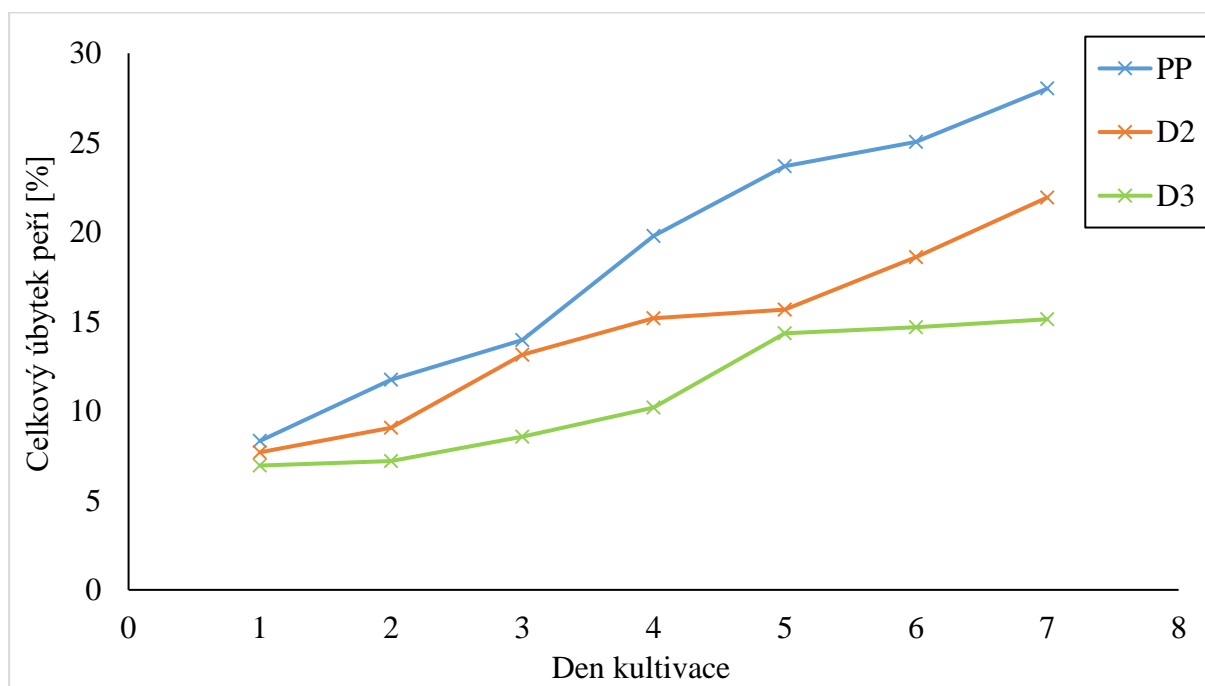
Peří je obecně těžce rozložitelné, ale existuje několik mikroorganismů, které jsou schopny ho degradovat. Tato mikrobiální degradace peří, zejména odpadního keratinu, je ekologicky a ekonomicky zajímavou metodou eliminace tohoto odpadu. Proces degradace peří byl dalším parametrem, který byl monitorován během stanovení růstové křivky u všech testovaných mikroorganismů.

Tabulka č. 6: Celkový úbytek peří vyjádřený v procentech

		Den kultivace						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Pseudomonas putida</i>	Úbytek peří [%]	8,32	11,75	13,97	19,78	23,69	25,04	28,03
<i>Pseudomonas gessardii</i>		7,69	9,07	13,14	15,18	15,66	18,60	21,94
<i>Pseudomonas fulva</i>		6,95	7,20	8,55	10,19	14,33	14,68	15,13

Navážka promytého a suchého peří činila 20 g/l a bylo prokázáno, že v průběhu kultivace docházelo k jeho postupné degradaci.

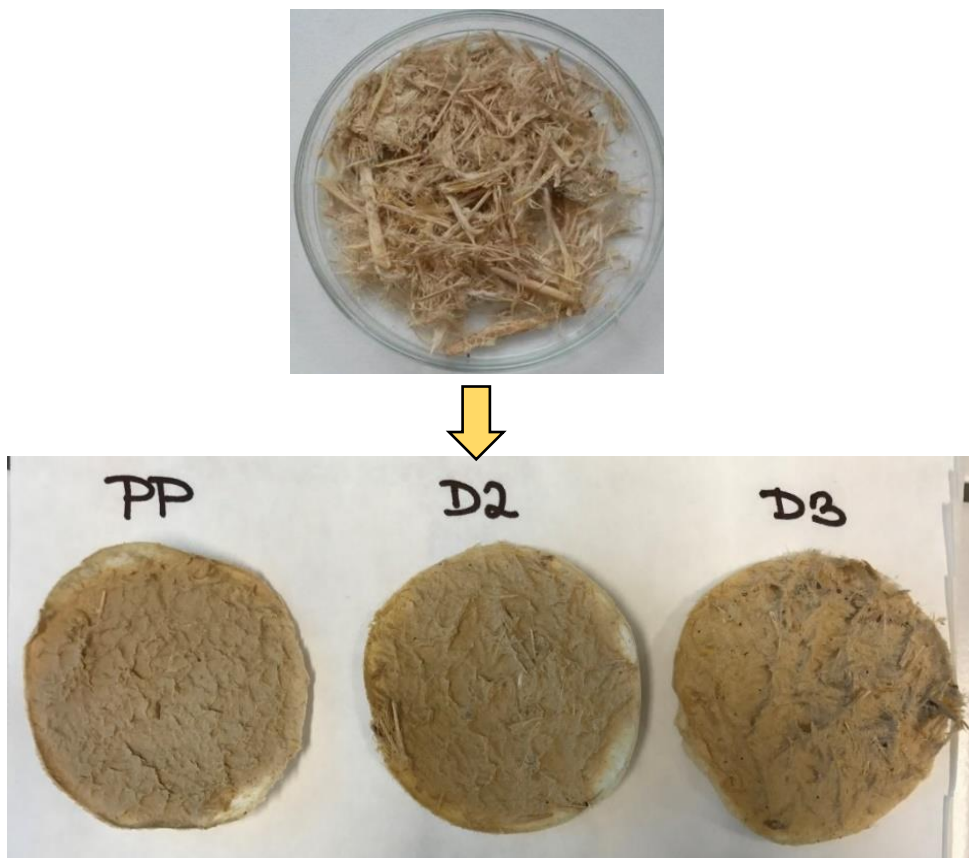
Pseudomonas putida je jedna z bakterií nalezených v peří u volně žijících ptáků a jak je patrné (z Tabulka č. 6) je schopna v minerálním médiu poměrně intenzivní eliminace peří. Bakterie byly i po sedmi dnech stále schopné utilizovat peří, i když byla koncentrace biomasy a hodnota pH nižší. Když pomineme regulaci pH a biomasy, tak by stálo za zváženou prodloužit dobu kultivace u bakterií *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas gessardii*, kde množství zdegradovaného peří stále stoupalo. Naopak bakterie *Pseudomonas fulva* byla nejméně schopna degradovat peří a zhruba od pátého dne kultivace začala její degradační aktivita stagnovat. Byl sestrojen graf závislosti úbytku peří na čase kultivace (Obr. 12).



Obr. 12: Závislost celkového úbytku peří na době kultivace

Degradace peří je vždy doprovázena uvolňováním rozpustných peptidů a aminokyselin v kultivačním médiu. Určitá část rozpustného keratinu z peří se převede na mikrobiální biomasu a některé z nich jsou hydrolyzovány na aminokyseliny působením proteáz. Rozsah

uvolňovaných rozpustných proteinů a aminokyselin se tedy liší u každého organismu [63–64]. Není bez zajímavosti, že během kultivace docházelo k faktickému „ztekucení“ peří – původně pevný substrát se během několika dní proměnil v kašovitou hmotu tak, jak je možné spatřit na Obr. 13 a Obr. 14.



Obr. 13: Ukázka degradace peří pomocí mikroorganismů. Na prvním obrázku je promyté a vysušené peří před degradací, zatímco na druhém obrázku se nachází peří po degradaci pomocí mikroorganismů. Je patrné, že námi zvolené kmeny byly schopny degradovat peří



Obr. 14: Ukázka rozkladu peří u všech námi použitých mikroorganismů –sedmý den kultivace

4.1.4 Výsledky prvkové analýzy

Cílem studie bylo prostřednictvím prvkové analýzy stanovit obsah prvků v nedegradovaném, promytém a vysušeném peří a v peří, které bylo podrobeno degradaci pomocí mikroorganismů. Obsah zájmových prvků byl stanoven na elementárním spalovacím analyzátoru. Každý vzorek byl proměřen třikrát, tyto hodnoty byly zprůměrovány a chybové úsečky byly vypočteny pomocí funkce SMODCH. Výsledky byly mezi sebou porovnány, aby bylo zjištěno, jestli má degradace peří pomocí mikroorganismů *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3) vliv na složení peří.

Tabulka č. 7: Prvkové složení promytého, vysušeného peří a peří, které podlehlo degradaci

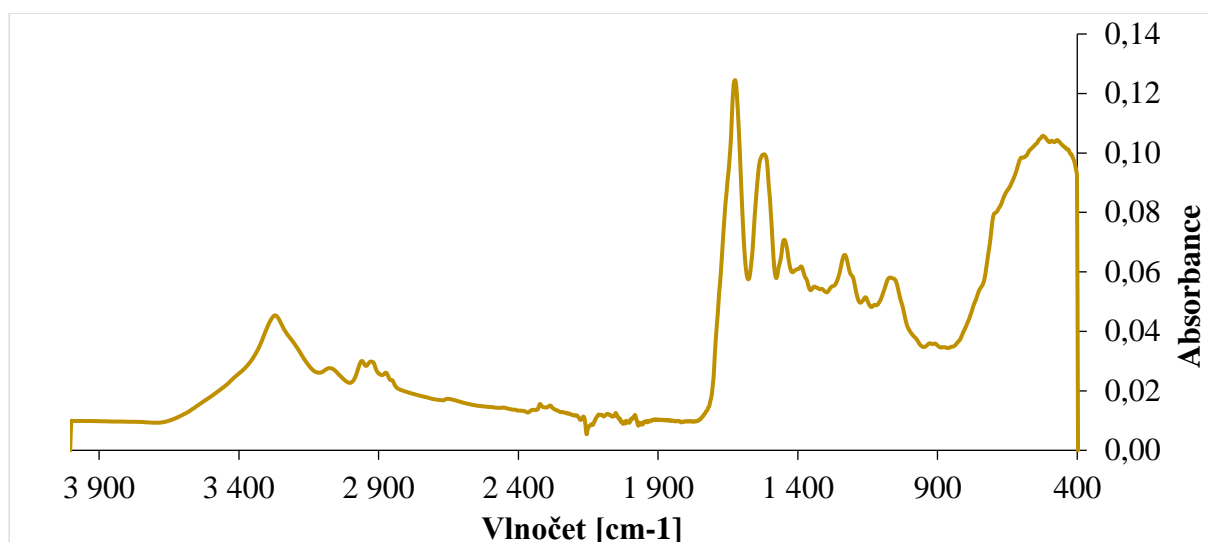
	Dusík (hm. %)	Uhlík (hm. %)	Vodík (hm. %)	Síra (hm. %)
Promyté peří	17,19±0,30	53,15±0,30	7,75±0,13	0,59±0,84
Peří – PP	16,37±0,07	50,75±0,04	7,63±0,05	-
Peří – D2	16,05±0,19	49,73±0,27	7,52±0,14	1,10±0,09
Peří – D3	16,60±0,10	51,03±0,48	7,55±0,07	0,29±0,41

Tabulka č. 7 zobrazuje výsledky prvkové analýzy, kdy byly vyhodnoceny hmotnostní procenta jednotlivých prvků. Zdá se, že proces degradace nemá na prvkové složení peří výrazný vliv, což dává smysl, jelikož je degradace peří doprovázena štěpením peptidické vazby, ale hlavní frakce tedy protein (keratin) pořád zůstává chemicky stejná.

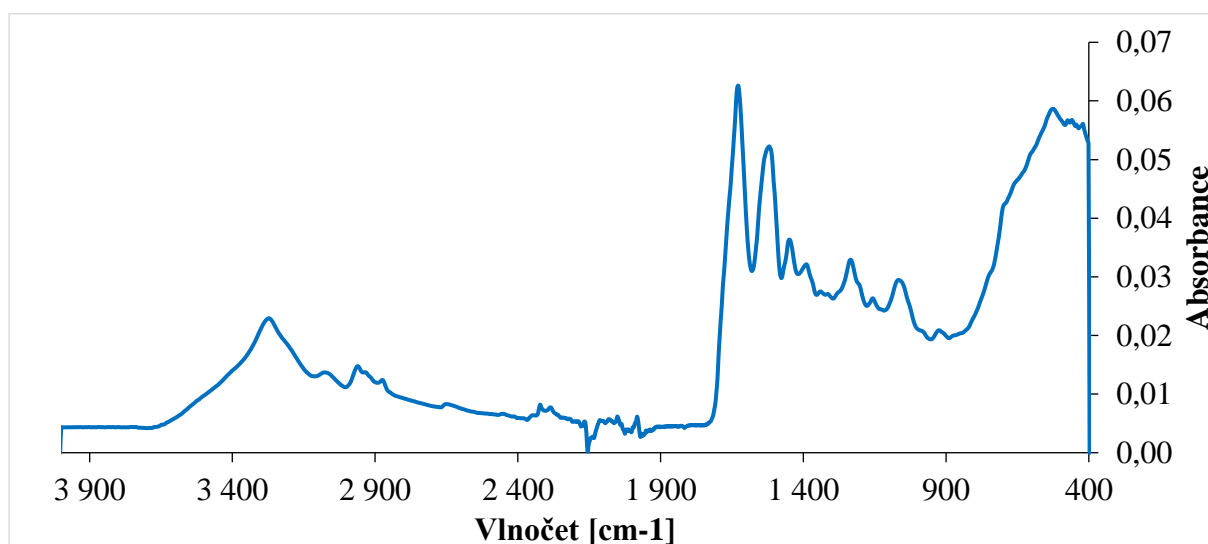
4.1.5 Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) se řadí mezi analytické metody poskytující informaci o chemickém složení organického i anorganického vzorku na základě určení charakteristických funkčních skupin a vazeb po absorpci infračerveného záření vzorkem. Výstupem analýzy je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, vyjádřené obvykle v procentech transmitance nebo jednotkách absorbance na vlnové délce dopadajícího záření. Tento experiment byl proveden se všemi zkoumanými kmeny a pro porovnání i s nedegradovaným, promytým a vysušeným peřím. Měření bylo provedeno v rozsahu 400 až 4000 cm⁻¹.

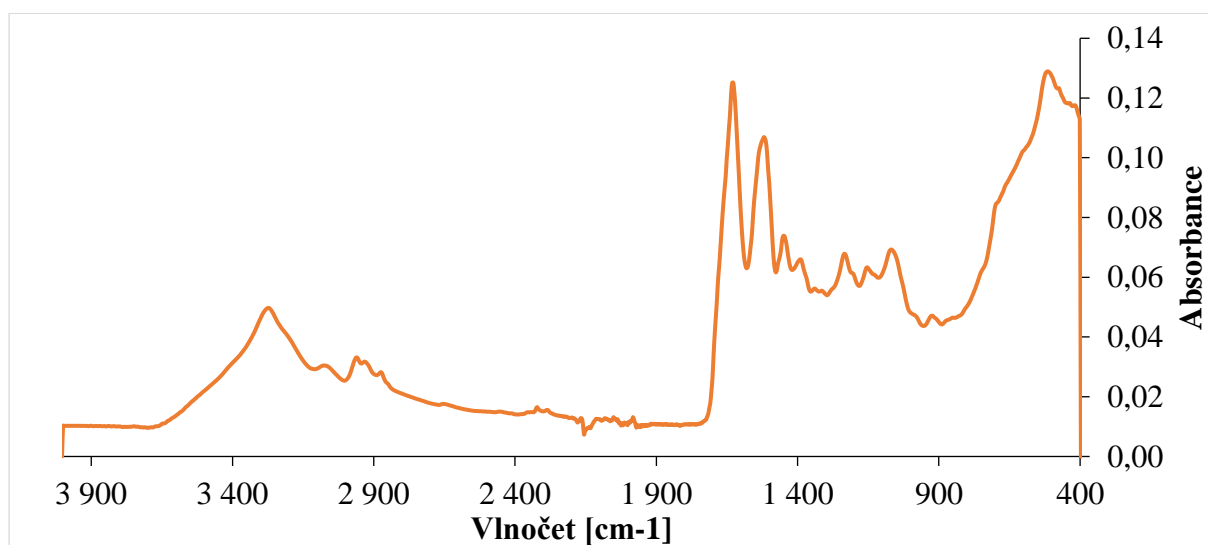
Jednotlivá spektra pro nedegradované peří, bakterie *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3) jsou uvedeny na Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17 a Obr. 18.



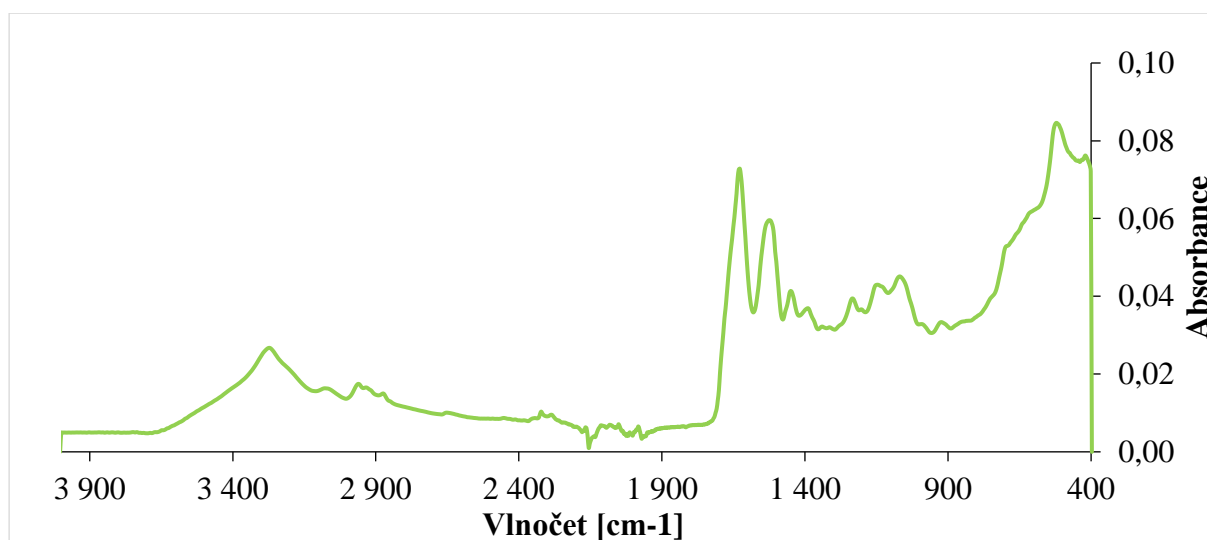
Obr. 15: IČ spektrum nedegradovaného, promytého a vysušeného peří



Obr. 16: IČ spektrum bakteriálního kmene *Pseudomonas putida* (PP)



Obr. 17: IČ spektrum bakteriálního kmene *Pseudomonas gessardii* (D2)



Obr. 18: IČ spektrum bakteriálního kmene *Pseudomonas fulva* (D3)

Nedegradované peří i peří degradované pomocí mikroorganismů vykazuje typické aminoskupiny a přítomnost karboxylové skupiny. Vyskytuje se zde například N-H, C-N a C=O vazba. Tabulka č. 8 popisuje hlavní píky v infračervených spektrech.

Spektra dokazují, že proces degradace nemá vliv na chemickou podstatu peří, jelikož jsou spektra před a po degradaci téměř totožná. Tento výsledek potvrzuje očekávání a je také v souladu s výsledky prvkové analýzy (kapitola 4.1.4). Dominantní proteinová frakce peří je postupně štěpena příslušnými enzymy (převážně keratinázou) za vzniku ve vodě rozpustných fragmentů – aminokyselin a oligopeptidů, které jsou následně využívány bakteriemi. Takže během procesu degradace peří se významně nemění chemická podstata materiálu, jen se postupně snižuje jeho molekulová hmotnost.

Tabulka č. 8: Popis hlavních píků v IČ spektrech

Oblast vibrací [cm ⁻¹]	Funkční skupiny
3270	valenční vibrace N-H a O-H vazby v alkoholech
3076	valenční symetrická vibrace C-H vazeb v C=C (vinyl)
2960	asymetrická valenční vibrace C-H vazeb v CH ₃
2927	asymetrická valenční vibrace C-H vazeb v CH ₂
2874	symetrická valenční vibrace C-H vazeb v CH ₃
1625	α-helix, C=O valenční vibrace v amidech (sekundární amidy)
1520	β-skládaný list, C=O vibrace
1448	deformační vibrace C-H vazeb v CH ₂ a CH ₃ skupinách
1388	deformační vibrace C-H vazeb v CH ₃ skupinách
1340	deformační vibrace C-H vazeb v methylových skupinách
1232	C-N vibrace v sekundárních amidech
1070	S-O vibrace v cysteinu

4.1.6 Výsledky stanovení proteázové aktivity

Proteáza je skupina enzymů katalyzující hydrolýzu proteinů na peptidy a oligopeptidů na aminokyseliny. Vzhledem k tomu, že mají proteiny vysokou molekulovou hmotnost, tak se uskutečňuje první enzymatický stupeň degradace proteinů na vnější straně mikrobiální buňky. Specifickými transportními systémy mohou být do buněk transportovány sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (např. aminokyseliny) a tady jsou poté aminokyseliny deaminovány. Existuje několik substrátů pro stanovení proteázové aktivity. Mezi nejznámější substráty patří želatina, kasein, azokasein, peptidy a albuminy [65].

Byla změřena proteázová aktivita extracelulárních enzymů přítomných v médiu pomocí azokaseinu a azoalbuminu. Jako vhodnější substrát pro stanovení proteázové aktivity byl na základě experimentů vybrán azokasein. Při působení proteázových enzymů dochází k odštěpení azopeptidů a tím ke zbarvení roztoku. Pomocí spektrofotometru byly získány hodnoty absorbancí a z nich byla vypočtena proteázová aktivita (viz Tabulka č. 9) pomocí vzorce 1:

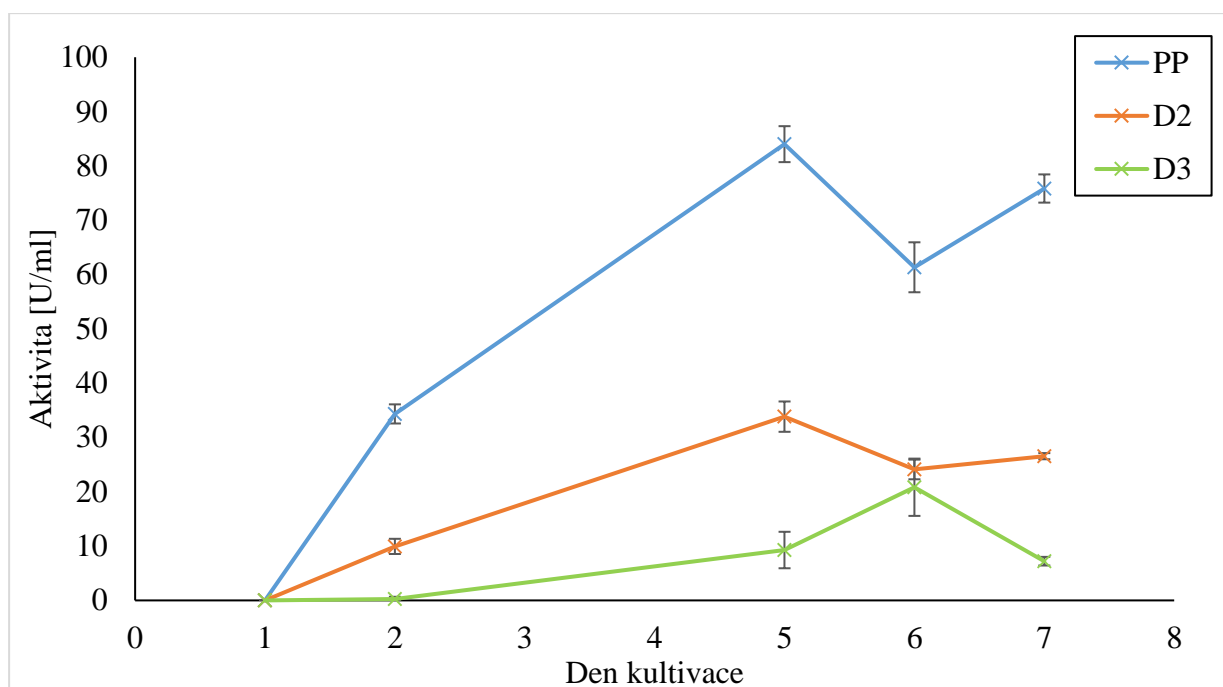
$$a = \frac{A \cdot 1000}{\text{doba inkubace}} \cdot 10 \quad 1$$

kde A představuje hodnotu absorbance a 10 přepočet 0,1 ml na 1 ml. [66]

Tabulka č. 9: Závislost proteázové aktivity na čase kultivace

	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>
Den kultivace	Aktivita [U/ml]		
1	0	0	0
2	34,33±1,76	9,94±1,40	0,28±0,39
5	84,00±3,31	33,83±2,79	9,28±3,36
6	61,33±4,60	24,11±1,81	20,83±5,27
7	75,83±2,60	26,56±0,57	7,22±0,80

Hodnoty proteázových aktivit byly vypočteny ze spektrofotometricky naměřených hodnot (příloha 1) a byla též vynesena závislost proteázové aktivity na čase kultivace.



Obr. 19: Závislost proteázové aktivity na čase kultivace

Hlavním cílem bylo zjistit, ve kterém dni kultivace jednotlivých kmenů je proteázová aktivita nejvyšší. Největší proteázová aktivita (jak je vidět na Obr. 19) byla stanovena pátý den u bakterie *Pseudomonas putida* a hodnota této stanovené aktivity byla $84,00 \pm 3,31$ U/ml. Proteázová aktivita u kmene *Pseudomonas putida* vzrůstala, a to i přesto, že koncentrace biomasy a hodnota pH byla ke konci kultivace nižší. Obecně lze říci, že průběh proteolytické aktivity kopíruje růst biomasy. Hodnoty aktivit u *Pseudomonas gessardii* a *Pseudomonas fulva* jsou nižší. Ze začátku kultivace u nich mírně stoupá proteázová aktivita, což by mohla způsobit přítomnost snadno rozložitelných oligopeptidů.

Všechny kmeny dosáhly v průběhu týdenní kultivace maxima a po něm u všech následoval pokles proteázové aktivity. Příčina následného poklesu aktivity proteáz může být potlačení jejich exprese vysokou koncentrací konečných produktů, mezi které mohou patřit aminokyseliny, amonné ionty nebo snadno metabolizovatelné zdroje uhlíku [67].

4.1.7 Výsledky stanovení keratináz pomocí keratinazuru

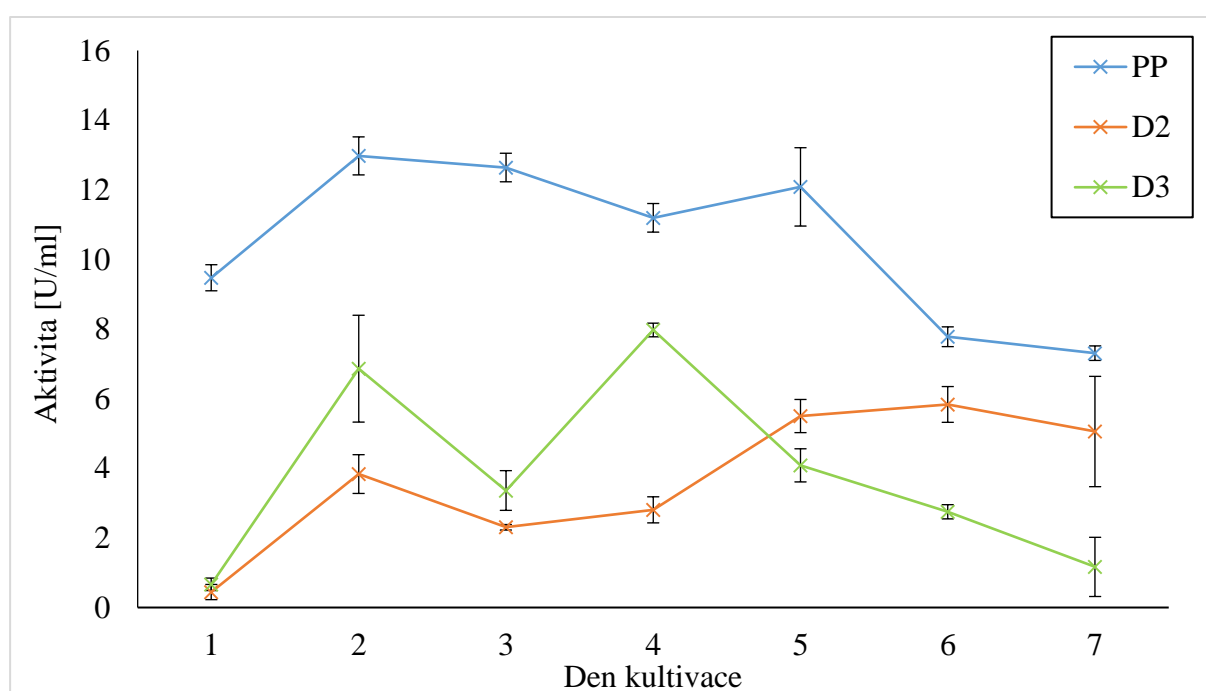
Degradace keratinu se většinou provádí pomocí gram-negativní bakterie, ačkoliv existuje již několik zpráv o degradaci peří za pomoci gram-pozitivních bakterií. Všechny námi použité bakterie byly gram-negativní. Unikátní struktura keratinu je velmi odolná proti proteolytickému štěpení a vyžaduje proto aktivitu specializovaných proteáz nazývaných keratinázy. Keratinázy hydrolyzují keratin na menší molekuly a jsou považovány za hodnotný biotechnologický produkt, který je možné využít pro přípravu enzymatického hydrolyzátu peří, který má významné krmivářské a biotechnologické využití jako hodnotný zdroj aminokyselin. Produkce hydrolyzátu pomocí mechanického a chemického zpracování vede ke zničení esenciálních aminokyselin a k poklesu výživové hodnoty. Izolované kmeny jsou schopny produkovat keratinázy a můžou být použity jednak pro degradaci peří a současnou produkci keratináz [68].

Keratinázy degradují kompaktní keratinové materiály, což je odlišné od více typických proteáz. Mnoho mikroorganismů je schopno degradovat nativní kuřecí peří k uvolnění volných aminokyselin, zejména methioninu a lysinu [69].

Metoda pro stanovení keratináz musela být nejprve optimalizována. Keratinazur, který byl dodán v dlouhých vláknech, byl pomocí tekutého dusíku a třecí misky s tloučkem rozdrčen, kvůli zvětšení dostupného povrchu a usnadnění štěpení azokeratinu enzymy. Oproti standardnímu protokolu poskytnutému dodavatelem substrátu byla také optimalizována teplota a doba inkubace, kdy z původních 50 °C byla teplota snížena na 37 °C a inkubace probíhala po dobu 2 hodin. Hodnoty keratinázových aktivit (Tabulka č. 10) byly vypočteny ze spektrofotometricky naměřených hodnot a byla vypočtena keratinázová aktivita pomocí vzorce 1 (viz výše), kde A představuje hodnotu absorbance a 10 přepočet 0,1 ml na 1 ml.

Tabulka č. 10: Závislost keratinázové aktivity na čase kultivace

	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas gessardii</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>
Den kultivace	Aktivita [U/ml]		
1	9,47±0,37	0,44±0,22	0,67±0,18
2	12,97±0,55	3,83±0,56	6,86±1,53
3	12,64±0,41	2,31±0,08	3,36±0,57
4	11,19±0,41	2,81±0,37	7,97±0,20
5	12,08±1,12	5,50±0,48	4,08±0,48
6	7,78±0,28	5,83±0,51	2,75±0,20
7	7,31±0,21	5,06±1,58	1,17±0,85



Obr. 20: Závislost keratinázové aktivity na čase kultivace

Nejvyšší keratinázová aktivita byla naměřena u mikroorganismu *Pseudomonas putida* ($12,97 \pm 0,55$ U/ml), avšak po pátém dnu začala klesat. Tento pokles souvisí s tím, že pátý den začala u daného mikroorganismu klesat i koncentrace biomasy a hodnota pH (viz výše). U bakterie *Pseudomonas fulva* se aktivita snižuje po čtvrtém dnu kultivace, což může souviset se stagnací u degradace peří. Maximální hodnota keratinázové aktivity u *Pseudomonas fulva* byla tedy naměřena čtvrtý den kultivace a činila $7,97 \pm 0,20$ U/ml. *Pseudomonas gessardii*, což je další mikroorganismus izolovaný z půdy znečištěné ropou, měl maximální naměřenou hodnotu keratinázové aktivity šestý den kultivace a činila $5,83 \pm 0,51$ U/ml. Závislost keratinázové aktivity je znázorněna na Obr. 20.

4.2 Produkce PHA

Další ideou, které jsme se experimentálně věnovali, bylo možné propojení biodegradace peří a současné biotechnologické produkce PHA. Jak již bylo uvedeno výše, při kultivaci na peří jako jediném substrátu, neakumulovaly testované bakteriální kmeny detekovatelné množství PHA. Proto byl jako uhlíkatý substrát testován odpadní fritovací olej (20 g/l), po 24 hodinách kultivace pak byla přidána kyselina oktanová (2 g/l) jako prekurzor MCL-PHA. V prvním experimentu byla jednoduše otestována schopnost bakterií akumulovat PHA v tomto experimentálním uspořádání, propojení s degradací peří bylo provedeno v následujících experimentech. Tabulka č. 11 prezentuje obsah a složení PHA u testovaných kmenů v průběhu kultivace stručně popsané výše.

Tabulka č. 11: Obsah a složení polyhydroxyalkanoátů u testovaných kmenů

	1. den kultivace		
	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]	PHA [g/l]
<i>Pseudomonas putida</i>	0,46	-	-
<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,58	5,4	0,09
<i>Pseudomonas fulva</i>	0,15	-	-
	2. den kultivace		
	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]	PHA [g/l]
<i>Pseudomonas putida</i>	1,45	61,5	0,89
<i>Pseudomonas gessardii</i>	1,79	32,0	0,57
<i>Pseudomonas fulva</i>	1,11	12,1	0,13
	3. den kultivace		
	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]	PHA [g/l]
<i>Pseudomonas putida</i>	1,37	42,3	0,58
<i>Pseudomonas gessardii</i>	2,51	21,8	0,55
<i>Pseudomonas fulva</i>	1,25	-	-

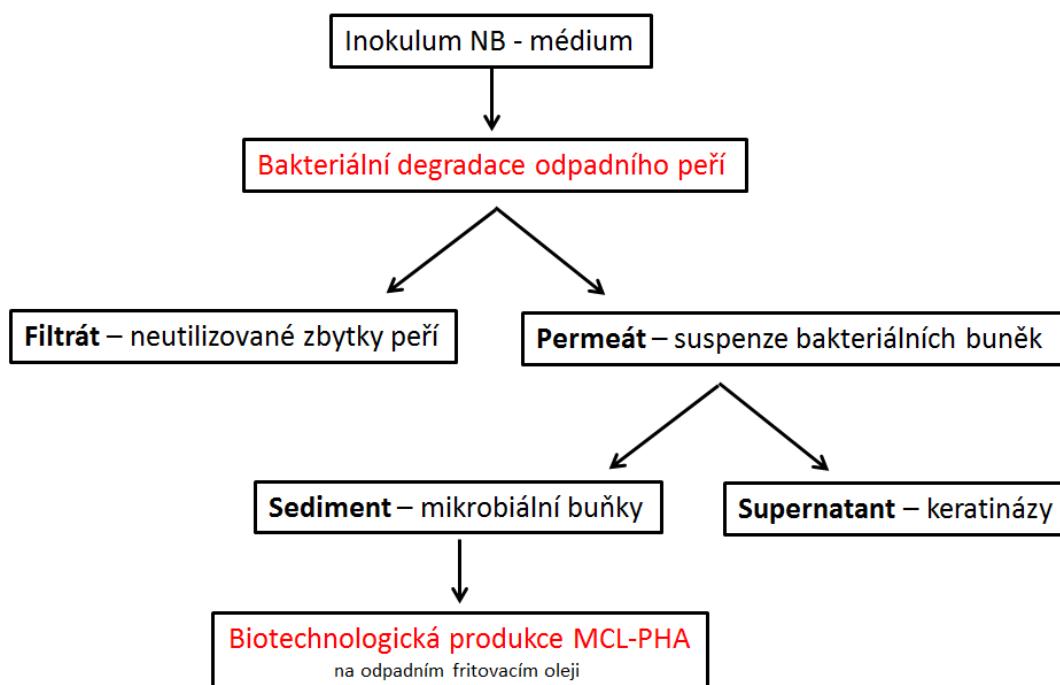
Kmeny při kultivaci na oleji s kyselinou oktanovou akumulují relativně vysoké množství PHA, přičemž se jedná prakticky výhradně o homopolymer 3-hydroxyoktanové kyseliny. Obsah polyhydroxyalkanoátů v biomase je jednak závislý na kultivačních podmínkách, ale také

na čase. Tabulka č. 11 uvádí, že u všech kmenů byl největší obsah PHA druhý den kultivace a poté začal obsah klesat. Pokles může být způsoben tím, že si kmeny spotřebovaly důležité živiny a nároky svého metabolismu musely pokrýt z intracelulárních zásob – PHA.

Koncentrace polyhydroxyalkanoátů, vyjadřující procentuální množství akumulovaného PHA v biomase na množství použitého substrátu byla nejvyšší druhý den kultivace u kmene *Pseudomonas putida*, a to 0,89.

4.3 Propojení produkce PHA a degradace peří

Při dalším experimentu byly všechny bakterie kultivovány na oleji za účelem zhodnocení jejich schopnosti využívat uhlíkatý zdroj pro svou výživu a akumulaci polyhydroxyalkanoátů. Jako inokulum byla využita bakteriální biomasa nekultivovaná na odpadním peří. Logika uvažovaného procesu je znázorněna na Obr. 21.



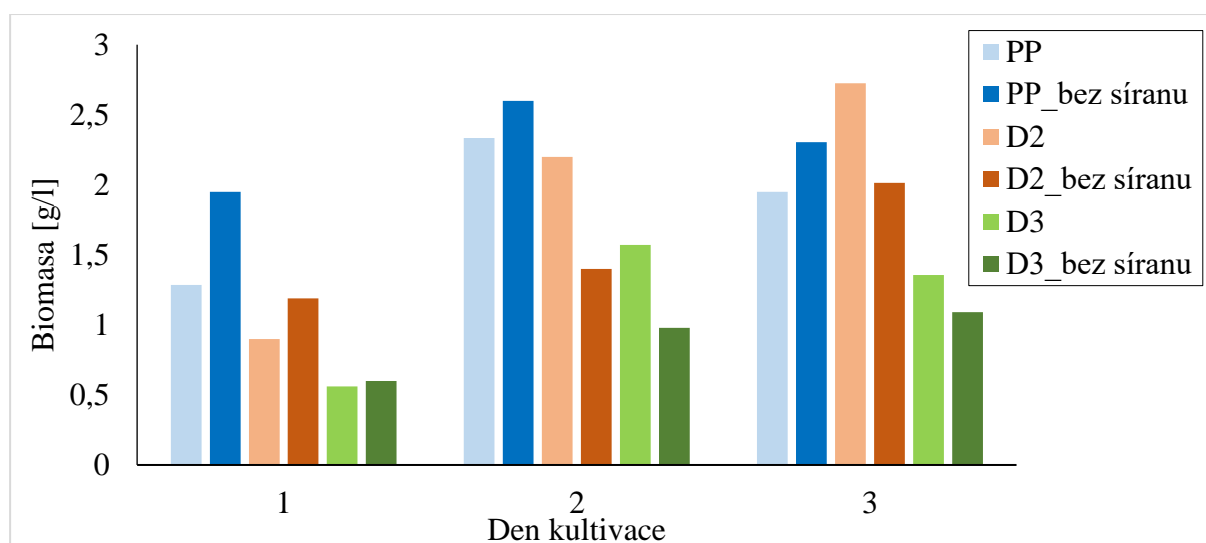
Obr. 21: Logika uvažovaného propojení biodegradace peří a produkce MCL-PHA

4.3.1 Výsledky stanovení hodnoty pH a biomasy

Rychlost růstu biomasy ovlivňuje především teplota a hodnota pH. Inhibice růstu může být způsobena například hromadícími se zplodinami či úbytkem živin. Koncentrace biomasy se tedy mění s časem. Tabulka č. 12 prezentuje výtěžky biomasy během 72 h kultivace testovaných bakteriálních kmenů na odpadním oleji a kyselině oktanové. Tento experiment byl prováděn v přítomnosti, ale také bez přítomnosti anorganického zdroje dusíku – síranu amonného. Jako inokulum byly použity buňky, které byly v předchozím kroku využity k degradaci peří a produkci keratinázy.

Tabulka č. 12: Hodnoty pH a biomasy v době kultivace

	1. den kultivace	2. den kultivace		3. den kultivace	
	biomasa [g/l]	pH	biomasa [g/l]	pH	biomasa [g/l]
<i>P. putida</i>	1,29	7,43	2,34	7,52	1,95
<i>P. putida bez síranu</i>	1,95	7,65	2,60	7,74	2,31
<i>P. gessardii</i>	0,9	7,34	2,20	7,47	2,73
<i>P. gessardii bez síranu</i>	1,19	7,46	1,40	7,66	2,02
<i>P. fulva</i>	0,56	7,38	1,57	7,48	1,36
<i>P. fulva bez síranu</i>	0,6	7,61	0,98	7,81	1,09



Obr. 22: Závislost biomasy na době kultivace u kmenů *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3)

Hodnoty pH se u všech kmenů v průběhu kultivace zvyšují. Vyšší pH je zřejmě způsobeno postupným hromaděním produktů deaminace nebo jiných produktů z degradace keratinu. Z Obr. 22 je patrné, že biomasa vzrostla. Pro bakterie *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fulva* byl neoptimálnější druhý den kultivace, kdy byla jejich biomasa maximální. U *Pseudomonas gessardii* byla biomasa nejvyšší až třetí den kultivace. Maximální množství biomasy 2,73 g/l (viz Tabulka č. 12) měla bakterie *Pseudomonas gessardii* třetí den kultivace. Biomasa bez síranu nebyla vysoká, optimální a především špatně sedimentovala během centrifugace, ale pro tvorbu polyhydroxyalkanoátů se ukázala jako lepší varianta.

Pokles biomasy může být způsoben tím, že kyselina oktanová po nějaké době mikroorganismy stresuje, čímž se zpomalí nebo zastaví jejich růst.

4.3.2 Výsledky stanovení PHA v biomase

Pro stanovení intracelulárního obsahu PHA je kvůli vysoké spolehlivosti volen právě plynový chromatograf. Za pomoci plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (FID) bylo stanoveno procentuální zastoupení polyhydroxyalkanoátů v kulturách. Hlavním cílem bylo zjistit, jestli limitace síranu amonného bude mít vliv na růst biomasy a akumulaci polyhydroxyalkanoátů.

Polyhydroxyalkanoáty mohou být produkovány ve vysokých množstvích některými bakteriemi. Pro případ horších životních podmínek si tyto polyestery vytvářejí bakterie jako zásobní zdroj uhlíku a energie. PHA se uvnitř bakteriálních buněk ukládají ve formě granulí, které jsou obaleny vrstvou fosfolipidů a proteinů, jež zásadně ovlivňují syntézu a utilizaci polyhydroxyalkanoátů [2, 70].

V laboratorních i přírodních podmínkách dochází ke tvorbě polymeru v podmínkách nedostatku, když je růst samotné biomasy omezen limitací přísunu dusíku, fosforu nebo kyslíku, přičemž přísun uhlíkatých surovin zůstává neomezen. Žádoucí je pochopitelně dosáhnout co nejvyšší koncentrace buněk v kultivačním médiu a zároveň co nejvyššího podílu PHA na hmotnosti buněk.

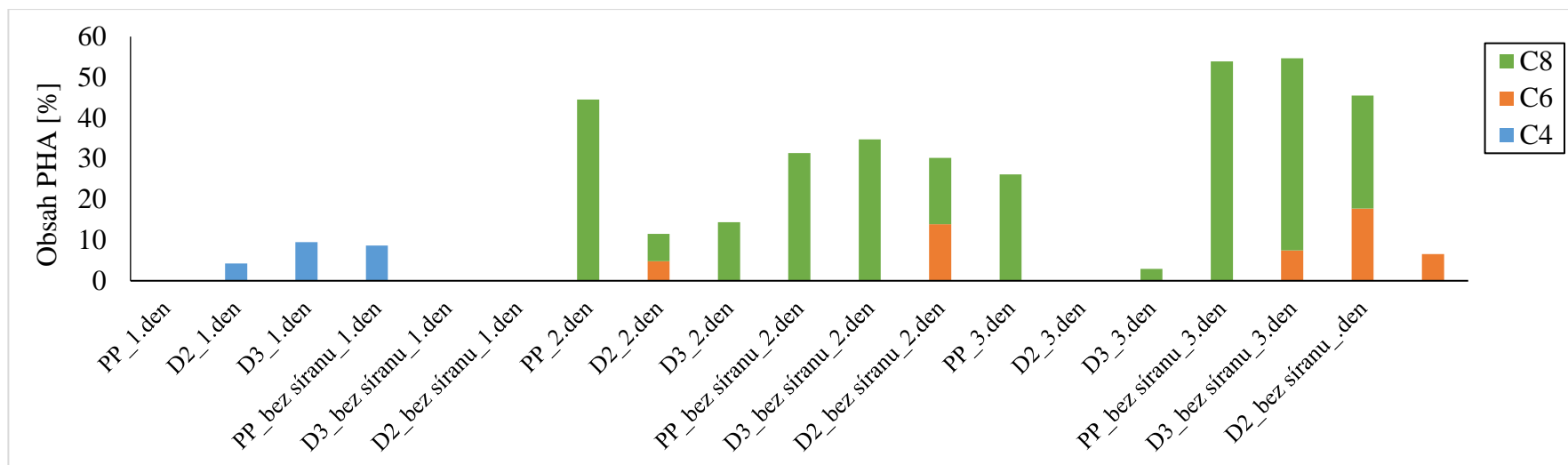
Tabulka č. 13: Procentuální zastoupení a koncentrace PHA u kmenů *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3) s limitací a také bez limitace anorganického zdroje dusíku – síranu amonného

	1. den kultivace			
	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]		PHA [g/l]
		C ₄ [%]		
<i>Pseudomonas putida</i>	1,29	-		-
<i>Pseudomonas gessardii</i>	0,90	4,3		0,04
<i>Pseudomonas fulva</i>	0,56	9,5		0,05
<i>Pseudomonas putida bez síranu</i>	1,95	8,6		0,17
<i>Pseudomonas gessardii bez síranu</i>	1,19	-		-
<i>Pseudomonas fulva bez síranu</i>	0,60	-		-
	2. den kultivace			
	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]		PHA [g/l]
		C ₆ [%]	C ₈ [%]	
<i>Pseudomonas putida</i>	2,34	4,8	44,5	1,15
<i>Pseudomonas gessardii</i>	2,20	-	6,7	0,15
<i>Pseudomonas fulva</i>	1,57	-	14,4	0,23
<i>Pseudomonas putida bez síranu</i>	2,60	-	31,4	0,82
<i>Pseudomonas gessardii bez síranu</i>	1,40	13,9	34,8	0,68
<i>Pseudomonas fulva bez síranu</i>	0,98	-	16,3	0,16
	3. den kultivace			
	Biomasa [g/l]	PHA v biomase [%]		PHA [g/l]
		C ₆ [%]	C ₈ [%]	
<i>Pseudomonas putida</i>	1,95	-	26,1	0,51
<i>Pseudomonas gessardii</i>	2,73	-	-	-
<i>Pseudomonas fulva</i>	1,36	-	2,9	0,04
<i>Pseudomonas putida bez síranu</i>	2,31	7,5	53,9	1,42
<i>Pseudomonas gessardii bez síranu</i>	2,02	17,7	47,2	1,31
<i>Pseudomonas fulva bez síranu</i>	1,09	6,6	27,8	0,38

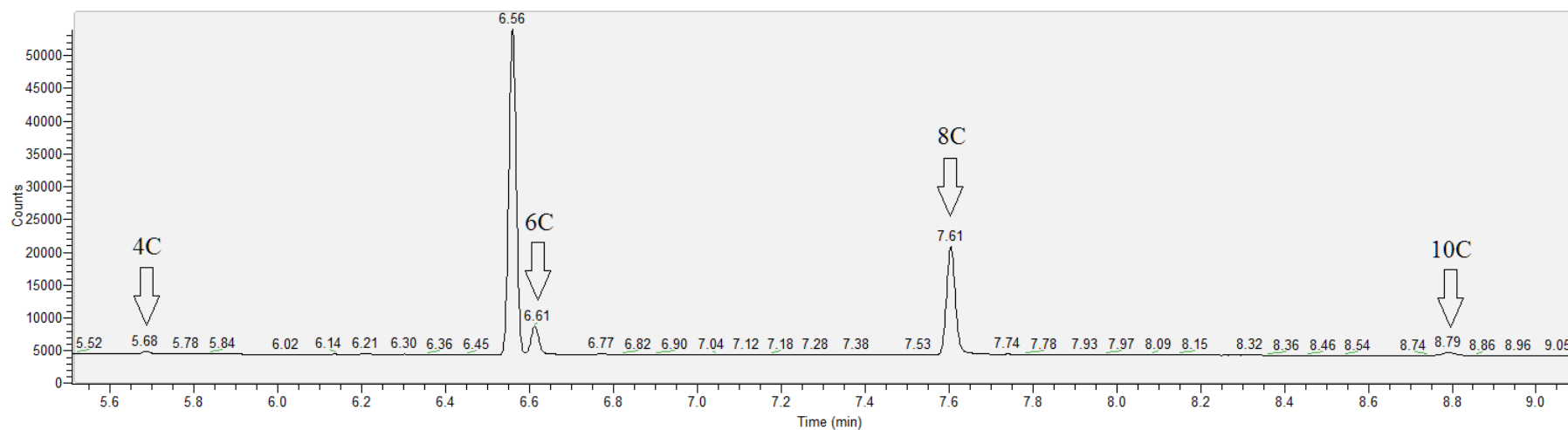
U kultur, které nebyly limitovány síranem amonným byl první den kultivace pozorován pouze nízký obsah C₄ polyhydroxyalkanoátů (viz Obr. 23). Po 48 hodinách kultivace byly naopak zpozorovány C₆ PHA u *Pseudomonas putida* a C₈ PHA u všech zkoumaných kmenů. Maximální množství C₈ PHA obsahovaly buňky po 48 hodinách kultivace (nejvíce u *Pseudomonas putida*– 44,5 %), poté pravděpodobně tato kultura vyčerpala uhlíkatý substrát v médiu a začala utilizovat PHA, protože obsah PHA v buňkách razantně klesl. Tabulka č. 13 shrnuje procentuální zastoupení polyhydroxyalkanoátů v kulturách a koncentraci PHA v g/l.

U kultur, které byly limitovány síranem amonným byly výtěžky PHA (především C₈) vysoké i po 72 hodinách a byly vyšší než u kultur se síranem. Bylo tudíž potvrzeno, že limitace dusíku má v našem případě vliv na tvorbu polyhydroxyalkanoátů. Nejvíce byla zastoupena kyselina 3-hydroxyoktanová (53,9 %) u bakterie *Pseudomonas putida* po 72 hodinách.

Z naměřených dat vyplývá, že při kultivaci u všech kmenů byla dominantní monomerní složkou akumulovaného polyesteru kyselina o počtu uhlíků 8, tedy kyselina 3-hydroxyoktanová. Druhou nejvíce zastoupenou složkou byla kyselina 3-hydroxyhexanová a kyselina 3-hydroxybutanová byla nejméně zastoupenou složkou. Hydroxykyseliny C₆ a C₈ nebyly první den přítomny, anebo byly přítomny v množství pod detekčním limitem. Na Obr. 24 je možné vidět ukázkou chromatogramu bakterie *Pseudomonas fulva* (D3) bez síranu amonného.



Obr. 23: Procentuální zastoupení polyhydroxyalkanoátů v kulturách v průběhu kultivace



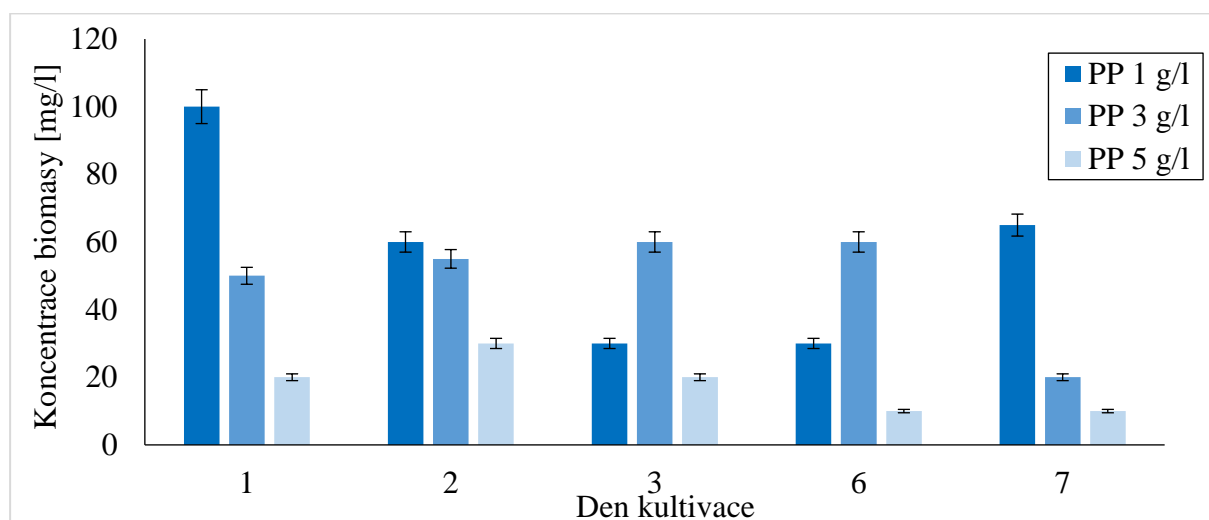
Obr. 24: Ukázka chromatogramu – analýza bakteriální biomasy u bakterie *Pseudomonas fulva* (D3) bez síranu amonného

4.4 Biodegradace ropných uhlovodíků

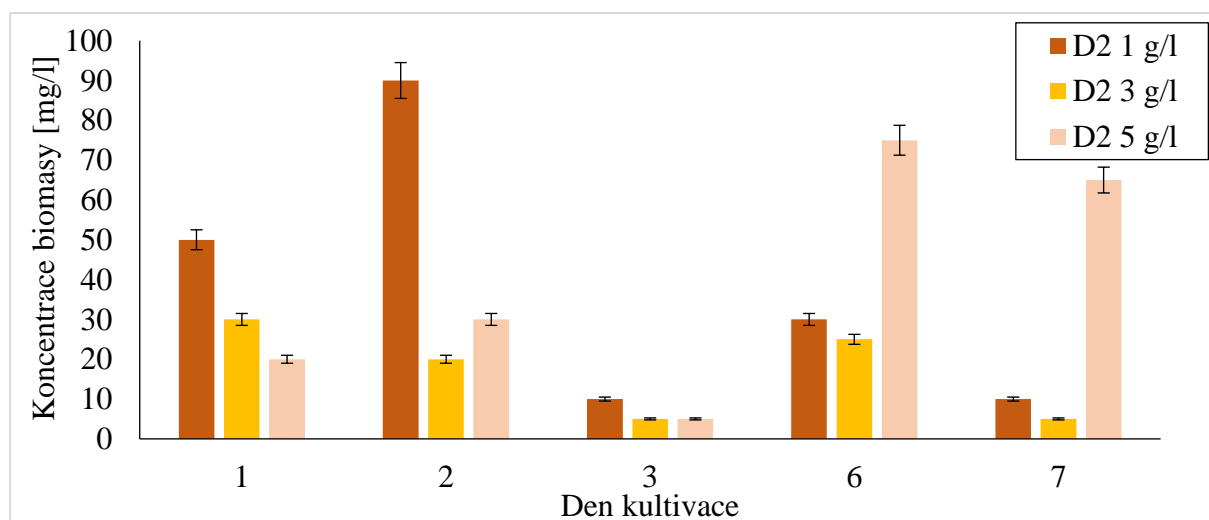
Surová ropa je složitá směs uhlovodíků a jiných organických sloučenin, které mohou při jejím úniku způsobit závažné ekologické problémy. Bioremediace je tak považována za efektivní, ekonomickou a univerzální metodu zpracování ropných kontaminantů. Surová nafta obsahuje různé sloučeniny a stává se, že jeden kmen nemusí být schopen degradovat úplně všechny složky ropy [71–72].

4.4.1 Výsledky stanovení biomasy u vybraných kmenů

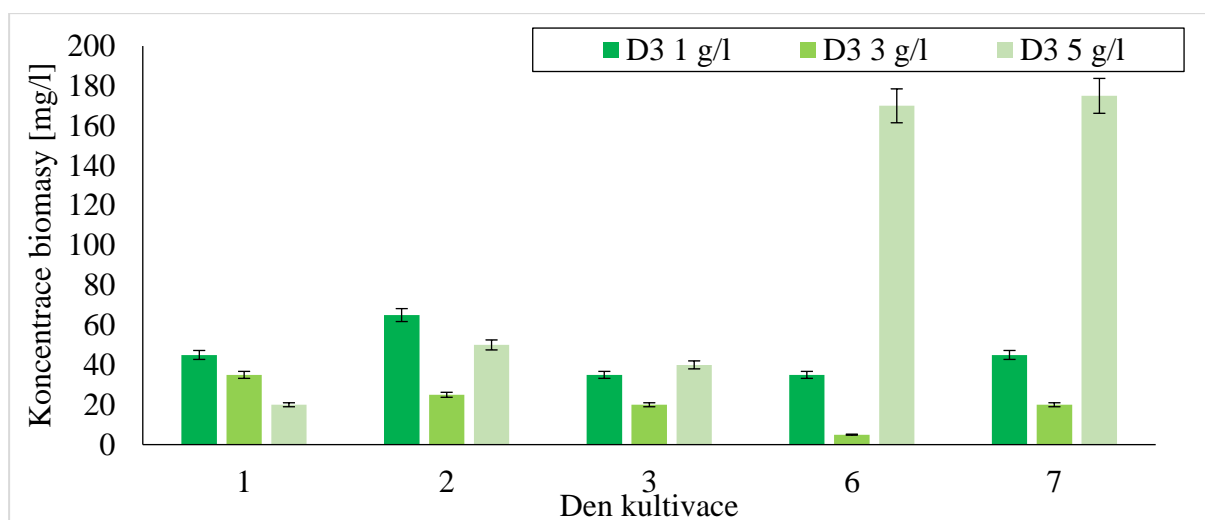
Jako vzorek byla v tomto experimentu použita motorová nafta. Tato studie byla provedena s bakteriálními kmeny izolovanými z půdy znečištěné ropou (*Pseudomonas gessardii* a *Pseudomonas fulva*), které jsou schopny štěpit ropu a růst na ní a se sbírkovým kmenem *Pseudomonas putida*, který je také schopen efektivní degradace alkalických uhlovodíků. Do kultivačního minerálního média byla přidána nafta ve třech různých koncentracích, která tak během kultivace sloužila jako jediný zdroj uhlíku a energie.



Obr. 25: Závislost koncentrace biomasy na době kultivace u kmene *Pseudomona putida* (PP)



Obr. 26: Závislost koncentrace biomasy na době kultivace u kmene *Pseudomona gessardii* (D2)



Obr. 27: Závislost koncentrace biomasy na době kultivace u kmene *Pseudomonas fulva* (D3)

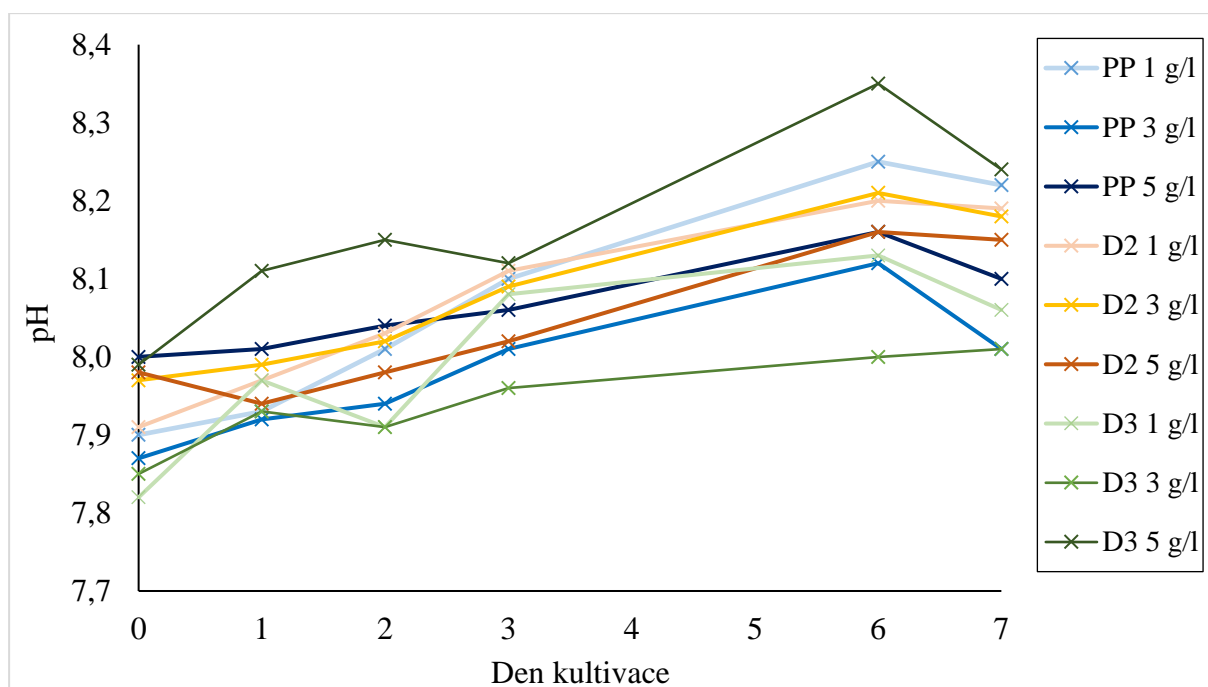
Pro lepší přehlednost byly zpracovány grafy (Obr. 25, Obr. 26 a Obr. 27) pro každý kmen zvlášť. Obecně lze říci, že bakterie rostly pomalu a biomasa nebyla nijak extrémně vysoká u žádného kmene. U bakterie *Pseudomonas putida* dokonce výsledky naznačují, že použitý substrát vykazoval spíše toxický efekt. Nejvyšší hodnota biomasy (175 mg/l) byla zaznamenána sedmý den kultivace u kmene *Pseudomonas fulva* při koncentraci nafty 5 g/l. Velkou roli na tvorbu biomasy hraje použitý mikroorganismus a koncentrace přidané nafty. Existují kmeny, které vysoká koncentrace nafty inhibuje (což byl v našem případě případ *P.putida*), ale i kmeny pro které je vyšší koncentrace optimálnější než nižší, protože při nízké koncentraci nafty mohou mít bakterie nedostatek zdroje uhlíku a živin. Při této studii se potvrdilo, že pro kmen *Pseudomonas fulva* byla výhodnější vyšší koncentrace (5 g/l) nafty, zatímco pro kmen *Pseudomonas putida* nižší.

V budoucí studii by bylo zajímavé zkusit kultivovat jiný počet dní (pro lepší adaptaci), jiné koncentrace nebo využít kombinovaná bakteriální konsorcia.

Příčinou nižších výtěžků biomasy může být řada limitujících faktorů, které mohly ovlivnit biodegradaci nafty. Jedním z těchto faktorů je teplota, která pro kmeny při této studii nemusela být optimální. Svou roli hrají i živiny, především dusík a fosfor, kdy jejich nedostatek taktéž může bránit biodegradaci. Stejně tak může biodegradaci inhibovat nadměrná koncentrace těchto živin [73].

4.4.2 Výsledky hodnoty pH u vybraných kmenů

Další faktor, který může zásadně ovlivnit mikrobiální degradaci je hodnota pH, jelikož extrémní alkalita nebo acidita značně zpomaluje degradaci. Je známa celá řada mikroorganismů, kdy některé přežívají ve velkém rozsahu pH, ale druhá řada je schopna akceptovat pouze malé změny.



Obr. 28: Závislost hodnoty pH na době kultivace

U všech kmenů při různých koncentracích nafty bylo zaznamenáno zvýšení pH od počátečního dne kultivace (Obr. 28). Je tedy patrné, že mikroorganismy jsou schopny měnit pH. Největší hodnota pH (8,35) byla naměřena u kmene *Pseudomonas fulva* při koncentraci nafty 5 g/l a nejmenších u téhož kmene, ale při koncentraci 3 g/l.

5 ZÁVĚR

- Cílem práce bylo posoudit využití PHA produkujících kmenů v bioremediačních technologiích. Převážná část experimentů se týkala především biodegradace odpadního peří.
- Odpad z peří se považuje za celosvětový problém, který je potřeba řešit. Jedním ze způsobů je biologický rozpad za pomoci mikroorganismů. Pro studii biodegradace peří byly použity tyto kmeny: *Pseudomonas putida* (PP), *Pseudomonas gessardii* (D2) a *Pseudomonas fulva* (D3).
- V průběhu 7 dní byla měřena růstová křivka jednotlivých kmenů při kultivaci na odpadním peří jako jediném zdroji uhlíku. V průběhu kultivace byla sledována koncentrace biomasy, pH, množství úbytku peří a proteázová a keratinázová aktivita. Průběh růstové křivky byl u všech kmenů rozdílný. Kmen *Pseudomonas putida* vykazoval rychlý nárůst buněk a dosáhl maxima koncentrace biomasy pátý den kultivace, kdy tato koncentrace činila 1,06 g/l. U kmene *Pseudomonas gessardii* byl nárůst buněk pozvolný a od pátého dne kultivace téměř neměnný. U kmene *Pseudomonas fulva* po celou dobu kultivace vzrůstala koncentrace biomasy velmi pomalu a její koncentrace se vyšplhala maximálně na hodnotu 0,5 g/l. Díky zvýšenému obsahu dusíku nebyly za našich podmínek v bakteriální biomase přítomny polyhydroxyalkanoáty, což bylo potvrzeno na plynovém chromatografu s FID.
- Bylo stanoveno množství eliminovaného peří v průběhu jednoho týdne. Ze studovaných bakterií se jako nejoptimálnější pro degradaci ukázala bakterie *Pseudomonas putida*, která po sedmi dnech utilizovala až 28,03 % peří, zatímco nejméně peří utilizovala bakterie *Pseudomonas fulva* a to pouze 15,13 %. Proteázová aktivita vzrůstala u všech kmenů, což mohla způsobit přítomnost snadno rozložitelných peptidů. Po nějaké době dosáhla u všech kmenů proteázová aktivita maxima a po něm následoval pokles. Nejvyšší keratinázová aktivita byla naměřena u kmene *Pseudomonas putida* ($12,97 \pm 0,55$ U/ml), která poklesla pátým dnem kultivace, kdy poklesla i hodnota pH a koncentrace biomasy.
- Při produkci polyhydroxyalkanoátů bylo taktéž využito propojení produkce PHA a degradace peří, kdy buňky nakultivované při produkci peří byly využity jako inokulum pro biosyntézu MCL-PHA. Pro tento experiment byly připraveny jednak média s anorganickým zdrojem dusíku – síranem amonným, ale taky bez něj. PHA se akumulují především při limitaci růstu nedostatkem některého nutrientu, nejčastěji dusíku nebo fosforu a při přebytku uhlíkatého zdroje. V našem experimentu byly tedy kmeny limitovány dusíkem a hodnota pH byla u těchto kultivačních baněk vyšší než u baněk bez limitace. Koncentrace biomasy byla u kmenů limitovaných síranem amonným nižší než u kmenů bez limitace síranu. Avšak vyšší podíl polyhydroxyalkanoátů, především kyseliny 3-hydroxyoktanové, vykazovaly kmeny bez síranu amonného. Nejvyššího výtěžku MCL-PHA bylo dosaženo u kmene *Pseudomonas putida*, kdy obsah MCL-PHA v sušině dosáhl vysoké hodnoty 54 % a výtěžek MCL-PHA 1,4 g/l.
- Z výsledků prvkové analýzy a FTIR analýzy vyplývá, že chemická podstata peří se během procesu degradace výrazně nemění.
- Při biodegradaci ropných uhlovodíků bylo nejlepších výsledků biomasy dosaženo u kmene *Pseudomonas fulva* (D3) při koncentraci nafty 5 g/l. Lze tedy říci, že pro tento kmen je

optimální použít vyšší koncentraci nafty, kdežto u kmene *Pseudomonas gessardii* (D2) je výhodnější nižší koncentrace modelového polutantu (1 g/l). U kmene *Pseudomonas putida* byla koncentrace biomasy velmi nízká. Nejmenší koncentrace biomasy bylo dosaženo při koncentraci nafty 5 g/l, což pro kmen mohla být příliš vysoká koncentrace, a tudíž pro něj mohla být toxická. U všech kmenů při koncentracích nafty 1, 3 a 5 g/l se zvýšila hodnota pH, kdy nejvyšší hodnotu pH vykazovala bakterie *Pseudomonas fulva* při koncentraci nafty 5 g/l.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KUMAR, A., B.S. BISHT, V.D. JOSHI a T. DHEWA. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES* [online]. 2011, **1**(6), 1079-1093 [cit. 2017-04-17]. ISSN 0976-4402. Dostupné z: <http://www.ipublishing.co.in/jesvol1no12010/EIJES2061.pdf>
- [2] ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické Listy* [online]. 2016, (110), 860-867 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_860-867.pdf
- [3] YOGESH, Chaudhari, Bhavana PATHAK a Fulekar M.H. PHA - Production Application and its Bioremediation in Environment. *I Research Journal of Environment Sciences* [online]. 2012, **1**(2), 46-52 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.isca.in/IJENS/Archive/v1/i2/9.ISCA-IJES-2012-009.pdf>
- [4] CHITTTURI, Ch.M.C.Kumari, P.Jeevana IAKSHMI a V.V. LAKSHMI. Microbial Keratinases and their Applications. *International Journal of Scientific & Engineering Research* [online]. India, 2015, **6**(2), 173-176 [cit. 2017-04-17]. ISSN 2229-5518. Dostupné z: <http://www.ijser.org/researchpaper/Microbial-Keratinases-and-their-Applications.pdf>
- [5] SHEKHAR SK, Jai Godheja. *Biodegradation of Keratin from Chicken Feathers by Fungal Species as a Means of Sustainable Development*. DOI: 10.4172/2155-6199.1000232. ISBN 10.4172/2155-6199.1000232. Dostupné také z: <https://www.omicsonline.org/open-access/biodegradation-of-keratin-from-chicken-feathers-by-fungal-species-as-a-means-of-sustainable-development-2155-6199.1000232.php?aid=27758>
- [6] BORKOVCOVÁ, Marie a Markéta ŽÁKOVÁ. *Biologie pro odpadové hospodářství*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-240-3.
- [7] HORÁKOVÁ, Dana. *Bioremediace*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-708-0416-5.
- [8] KÜNKEL, Andreas, Johannes BECKER, Lars BÖRGER, et al. *Polymers, Biodegradable*. DOI: 10.1002/14356007.n21_n01.pub2. ISBN 10.1002/14356007.n21_n01.pub2. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.n21_n01.pub2
- [9] KLEEGERG, I., K. WELZEL, J. VANDENHEUVEL, R.-J. MÜLLER a W.-D. DECKWER. *Characterization of a New Extracellular Hydrolase from Thermobifida fusca Degrading Aliphatic-Aromatic Copolyesters*. DOI: 10.1021/bm049582t. ISBN 10.1021/bm049582t. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm049582t>
- [10] YAMAMOTO-TAMURA, Kimiko, Syuntaro HIRADATE, Takashi WATANABE, Motoo KOITABASHI, Yuka SAMESHIMA-YAMASHITA, Tohru YARIMIZU a Hiroko KITAMOTO. *Contribution of soil esterase to biodegradation of aliphatic polyester*

- agricultural mulch film in cultivated soils*. DOI: 10.1186/s13568-014-0088-x. ISBN 10.1186/s13568-014-0088-x. Dostupné také z: <http://www.amb-express.com/content/5/1/10>
- [11] SHAH, Aamer Ali, Satoshi KATO, Noboru SHINTANI, Numbi Ramudu KAMINI, Toshiaki NAKAJIMA-KAMBE, Tohru YARIMIZU a Hiroko KITAMOTO. *Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters*. DOI: 10.1007/s00253-014-5558-1. ISBN 10.1007/s00253-014-5558-1. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5558-1>
- [12] WANG, Xilong, Xiaoying GUO, Yu YANG, Shu TAO, Baoshan XING, Tohru YARIMIZU a Hiroko KITAMOTO. *Sorption Mechanisms of Phenanthrene, Lindane, and Atrazine with Various Humic Acid Fractions from a Single Soil Sample*. DOI: 10.1021/es102468z. ISBN 10.1021/es102468z. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es102468z>
- [13] JUWARKAR, Asha A., Sanjeev K. SINGH a Ackmez MUDHOO. *A comprehensive overview of elements in bioremediation*. DOI: 10.1007/s11157-010-9215-6. ISBN 10.1007/s11157-010-9215-6. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11157-010-9215-6>
- [14] VIDALI, M. *Bioremediation. An overview*. Pure Appl. Chem 73. 2001; 1163–1172
- [15] NOVOTNÝ, Čeněk. *Biodegradace a biotechnologie*. Ostrava: Ostravská univerzita, 2005. ISBN 80-736-8096-3
- [16] AZUBUIKE, Christopher Chibueze, Chioma Blaise CHIKERE, Gideon Chijioke OKPOKWASILI a N. KALOGERAKIS. *Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects*. DOI: 10.1007/s11274-016-2137-x. ISBN 10.1007/s11274-016-2137-x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-016-2137-x>
- [17] CASTELO-GRANDE, Teresa a Domingos BARBOSA. Soil decontamination by supercritical extraction. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 2(2), 331-336. ISSN 1579-4377
- [18] DEPAOLI, David W. *Design equations for soil aeration via bioventing* [online]. [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1016/0956-9618(96)00144-0. ISBN 10.1016/0956-9618(96)00144-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0956961896001440>
- [19] LEE, Michael D. a C. Michael SWINDOLL. Bioventing for in situ remediation. *Hydrological Sciences Journal* [online]. 1993, 38(4) [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: http://hydrologie.org/hsj/380/hysj_38_04_0273.p
- [20] LEE, Jae Heung, Chioma Blaise CHIKERE, Gideon Chijioke OKPOKWASILI a N. KALOGERAKIS. *An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control: principles, advantages, limitations and prospects*.

- DOI: 10.1007/s12257-013-0193-8. ISBN 10.1007/s12257-013-0193-8. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-013-0193-8>
- [21] NIKOLOPOULOU, M., N. PASADAKIS, H. NORF a N. KALOGERAKIS. *Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids*. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.10.038. ISBN 10.1016/j.marpolbul.2013.10.038
- [22] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISBN 10.1016/j.procbio.2004.01.053. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959204000949>
- [23] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. *Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda*. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. ISBN 10.1016/j.mib.2010.02.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [24] CHEE, J., Yoga, S., Lau, N., Ling, S., Abed, R.M.M., 2010. *Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics*. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex research center, pp. 1395e1404
- [25] SUDESH, Kumar a Tadahisa IWATA. *Sustainability of Biobased and Biodegradable Plastics*. DOI: 10.1002/clen.200700183. ISBN 10.1002/clen.200700183. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/clen.200700183>
- [26] SNELL, Kristi D. a Oliver P. PEOPLES. *PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries*. DOI: 10.1002/bbb.161. ISBN 10.1002/bbb.161. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bbb.161>
- [27] MACRAE, R. M. a J. F. WILKINSON. *Poly- γ -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*: A value-added coproduct for biomass biorefineries*. DOI: 10.1099/00221287-19-1-210. ISBN 10.1099/00221287-19-1-210. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-19-1-210>
- [28] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. *Journal of Chemical Technology*. 2007, vol. 82, issue 3, s. 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [29] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. *Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice*. *Journal of Chemical Technology*. 2010, vol. 85, issue 6, s. 732-743. DOI: 10.1002/jctb.2392. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392>
- [30] DAWES, Edwin A. a Peter J. SENIOR. *The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms*. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60088-0. ISBN

- 10.1016/S0065-2911(08)60088-0. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291108600880>
- [31] OSTLE AG, Holt JG. *Nile Blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate*. *Appl Environ Microbiol*. 1982;44:238–241. Dostupné také z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241995/>
- [32] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0230-1
- [33] KESSLER, Birgit, Bernard WITHOLT, Adriano BRANDELLI, Yong-Jik LEE, Gae-Won NAM, Nam Joo KANG, Dong-Woo LEE a Adam LESNER. *Poly(3-Hydroxyalkanoates)* [online]. [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1002/0471250589.ebt168. ISBN 10.1002/0471250589.ebt168.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471250589.ebt168>
- [34] KIM, Beom Soo, Seung Chul LEE, Sang Yup LEE, Ho Nam CHANG, Yong Keun CHANG a Seong Ihl WOO. *Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control*. DOI: 10.1002/bit.260430908. ISBN 10.1002/bit.260430908. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260430908>
- [35] REDDY, C.S.K, R GHAI, Guglielmo RASHMI, V.C KALIA, Federico QUARANTA, Monica PITTALUGA, Stefania SABATINI, Paolo CASEROTTI, Paolo PARISI, Attilio PARISI a Daniela CAPOROSSI. *Polyhydroxyalkanoates: an overview*. *Bioresource Technology*. 2003, vol. 87, issue 2, s. 137-146. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [36] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. *Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda*. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, vol. 13, issue 3, s. 321-326. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527410000275>
- [37] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. *Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?*. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISBN 10.1016/j.micres.2016.07.010.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [38] PHILIP, S., T. KESHAVARZ, I. ROY, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. *Journal of Chemical Technology*. 2007, vol. 82, issue 3, s. 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [39] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. *Polyhydroxyalkanoates: an overview*. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISBN 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [40] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.

- ISBN 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [41] ANJUM , Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. *Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements*. . DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [42] MARTIN, David P. a Simon F. WILLIAMS. *Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial*. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00040-8. ISBN 10.1016/S1369-703X(03)00040-8. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000408>
- [43] GAJJAR, Chirag R. a Martin W. KING. *Resorbable fiber-forming polymers for biotextile application* [online]. USA: Springer, 2014 [cit. 2017-03-05]. ISBN 978-3-319-08305-6. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=Dmz1AwAAQBAJ&pg=PA29&lpg=PA29&dq=P\(4HB\)+elongation+to+break&source=bl&ots=CpwdiH9EXF&sig=GCMEEmixONeQOXJMOBNq-1ErnY&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwimsNiujcDSAhXKXhoKHfavAGEQ6AEIKzAD#v=onepage&q=P\(4HB\)%20elongation%20to%20break&f=false](https://books.google.cz/books?id=Dmz1AwAAQBAJ&pg=PA29&lpg=PA29&dq=P(4HB)+elongation+to+break&source=bl&ots=CpwdiH9EXF&sig=GCMEEmixONeQOXJMOBNq-1ErnY&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwimsNiujcDSAhXKXhoKHfavAGEQ6AEIKzAD#v=onepage&q=P(4HB)%20elongation%20to%20break&f=false)
- [44] AKIYAMA, Minoru, Yasuo TAIMA a Yoshiharu DOI. *Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus Alcaligenes utilizing long-chain fatty acids*. DOI: 10.1007/BF00174830. ISBN 10.1007/BF00174830. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00174830>
- [45] KIM, Young Baek, Robert W. LENZ a Yoshiharu DOI. *Polyesters from Microorganisms*. DOI: 10.1007/3-540-40021-4_2. ISBN 10.1007/3-540-40021-4_2. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/3-540-40021-4_2
- [46] BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00144-3. ISBN 10.1016/S0960-8524(99)00144-3. Dostupné také z: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960-8524\(99\)001443](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960-8524(99)001443)
- [47] SRIDEWI, Nanthini, Kesaven BHUBALAN a Kumar SUDESH. *Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem* [online]. [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.08.027. ISBN 10.1016/j.polymdegradstab.2006.08.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391006002680>
- [48] SUDESH, Kumar a Tadahisa IWATA. *Sustainability of Biobased and Biodegradable Plastics* [online]. [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1002/clen.200700183. ISBN 10.1002/clen.200700183. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/clen.200700183>

- [49] MADBOULY, Samy A., James A. SCHRADER, Gowrishankar SRINIVASAN, Kunwei LIU, Kenneth G. MCCABE, David GREWELL, William R. GRAVES a Michael R. KESSLER. *Biodegradation behavior of bacterial-based polyhydroxyalkanoate (PHA) and DDGS composites* [online]. [cit. 2017-01-22]. DOI: 10.1039/c3gc41503a. ISBN 10.1039/C3GC41503A. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3GC41503A>
- [50] MUHAMMADI, SHABINA, Muhammad AFZAL a Shafqat HAMEED. *Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications* [online]. [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1080/17518253.2015.1109715. ISBN 10.1080/17518253.2015.1109715. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17518253.2015.1109715>
- [51] STIBOROVA, Hana, Barbora BRANSKA, Tereza VESELA, et al. *Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids*. DOI: 10.1002/jctb.4912. ISBN 10.1002/jctb.4912. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4912>
- [52] JOSHI, Savitha G., M.M. TEJASHWINI, N. REVATI, R. SRIDEVI a D. ROMA. *Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium*. DOI: 10.3923/ijps.2007.689.693. ISBN 10.3923/ijps.2007.689.693. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ijps.2007.689.693>
- [53] GOVARTHANAN, Muthusamy, Thangasamy Selvan KUMAR, S.Arun PRAKASH a K. MANOHARAN. Keratinolytic bacteria isolated from chick fecal waste. *Environmental Science: An Indian Journal*. Trade Science, 2010, 5(4), 223-225. ISSN 0974 - 7451.
- [54] SIMS, J. T., D. W. MURPHY a T. S. HANDWERKER. *Composting of Poultry Wastes*. DOI: 10.1300/J064v02n04_07. ISBN 10.1300/J064v02n04_07. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J064v02n04_07
- [55] NALEWAY, Steven E., Jennifer R.A. TAYLOR, Michael M. PORTER, Marc A. MEYERS, Joanna MCKITTRICK, Nam Joo KANG, Dong-Woo LEE a Adam LESNER. *Structure and mechanical properties of selected protective systems in marine organisms* [online]. [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.10.033. ISBN 10.1016/j.msec.2015.10.033. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092849311530463X>
- [56] RIFFEL, Alessandro a Adriano BRANDELLI. *Keratinolytic bacteria isolated from feather waste*. DOI: 10.1590/S1517-83822006000300036. ISBN 10.1590/S1517-83822006000300036. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [57] ILHAM, Zerdani, Faïd MOHAMED a Malki ABDERAHIM. *Feather wastes digestion by new isolated strains Bacillus sp. in Morocco*. DOI: 10.5897/AJB2004.000-2012. ISBN 10.5897/AJB2004.000-2012. Dostupné také z: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/B2959CB32021>
- [58] MANJU, R. Isolation, Identification, Characterization of Bacillus subtilis producing the Keratinase Enzyme under Optimization, Purification and immobilization

method. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH*. 2013, 456-465. ISSN 2320-5407

- [59] RIFFEL, Alessandro, Françoise LUCAS, Philipp HEEB a Adriano BRANDELLI. *Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin*. DOI: 10.1007/s00203-003-0525-8. ISBN 10.1007/s00203-003-0525-8. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-003-0525-8>
- [60] SIVAKUMAR, N. a S. RAVEENDRAN. *Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage*. DOI: 10.1080/00071668.2014.996119. ISBN 10.1080/00071668.2014.996119. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00071668.2014.996119>
- [61] MORITA, Y., Q. HASAN, T. SAKAGUCHI, Y. MURAKAMI, K. YOKOYAMA a E. TAMIYA. *Properties of a cold-active protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104* [online]. [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1007/s002530051349. ISBN 10.1007/s002530051349. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051349>
- [62] DENKIN, S. M. a D. R. NELSON. Induction of Protease Activity in *Vibrio anguillarum* by Gastrointestinal Mucus. *Applied and environmental microbiology*. 1999, roč. 65, č. 8, s. 3555-3560.
- [63] KSHETRI, Pintubala, Debananda S. NINGTHOUJAM, Kyungmin KIM, Yong-Jik LEE, Gae-Won NAM, Nam Joo KANG, Dong-Woo LEE a Adam LESNER. *Keratinolytic activities of alkaliphilic *Bacillus* sp. MBRL 575 from a novel habitat, limestone deposit site in Manipur, India* [online]. [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1186/s40064-016-2239-9. ISBN 10.1186/s40064-016-2239-9. Dostupné z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2239-9>
- [64] DAROIT, Daniel J., Ana Paula F. CORRÊA, Adriano BRANDELLI, Yong-Jik LEE, Gae-Won NAM, Nam Joo KANG, Dong-Woo LEE a Adam LESNER. *Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus** [online]. [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2008.11.008. ISBN 10.1016/j.ibiod.2008.11.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830508002059>
- [65] HORÁKOVÁ, D., NĚMEC M., SZOSTKOVÁ M.: *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. Brno, Masarykova univerzita, 2007, Dostupné z: https://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf
- [66] RAI, Sudhir K. a Ashis K. MUKHERJEE. *Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04*. DOI: 10.1016/j.bej.2009.09.007. ISBN 10.1016/j.bej.2009.09.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09002940>

- [67] GEISSELER, D a W HORWATH. *Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon* [online]. [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.09.001. ISBN 10.1016/j.soilbio.2008.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071708003088>
- [68] KULKARNI, S.A. a A.R. JADHAV. Isolation and Characterization of Keratinolytic Bacteria from Poultry farm soils. *International Research Journal of Biological Sciences* [online]. 2014, 3(7), 29-33 [cit. 2017-04-10]. ISSN 2278-3202. Dostupné z: <http://www.isca.in/IJBS/Archive/v3/i7/7.ISCA-IRJBS-2014-003.pdf>
- [69] JIN, Hyeon-Su, Seon Yeong PARK, Kyungmin KIM, Yong-Jik LEE, Gae-Won NAM, Nam Joo KANG, Dong-Woo LEE a Adam LESNER. *Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates* [online]. [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1371/journal.pone.0172712. ISBN 10.1371/journal.pone.0172712. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0172712>
- [70] FLICKINGER, Michael C. a Stephen W. DREW. *Encyclopedia of Bioprocess Technology* [online]. New York, 1999. ISBN 9780471250586.
- [71] CHAILLAN, Frédéric, Anne LE FLÈCHE, Edith BURY, Y-hui PHANTAVONG, Patrick GRIMONT, Alain SALIOT a Jean OUDOT. *Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms*. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.04.006. ISBN 10.1016/j.resmic.2004.04.006. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250804001044>
- [72] ZHANG, Zhengzhi, Lixue GAI, Zhaowei HOU, et al. *Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils*. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.060. ISBN 10.1016/j.biortech.2010.05.060. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241000917X>
- [73] DAS, Nilanjana, Preethy CHANDRAN, Zhaowei HOU, et al. *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview*. DOI: 10.4061/2011/941810. ISBN 10.4061/2011/941810. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/btri/2011/941810/>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MEK	methylethylketon
TCE	trichlorethylen
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
VC	vinylchlorid
PHA	polyhydroxyalkanoáty
SCL	short-chain-length
MCL	medium-chain-length
UV	ultrafialová část spektra
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB–3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
P(4HB)	poly(4-hydroxybutyrát)
3HHx	3-hydroxyhexanoát
P(3HV)	poly(3-hydroxyvalerát)
HA	hydroxykyselina
C ₄	kyselina 3-hydroxybutanová
C ₆	kyselina 3-hydroxyhexanová
C ₈	kyselina 3-hydroxyoktanová
PLA	polylaktidy
PGA	polyglykolidy
PP	<i>Pseudomonas putida</i>
D2	<i>Pseudomonas gessardii</i>
D3	<i>Pseudomonas fulva</i>
NB	Nutrient Broth médium
IČ spektrum	Infračervené spektrum

8 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Závislost proteázové aktivity na čase kultivace

<i>Pseudomonas putida</i>					
Den kultivace	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}	a [U/ml]
1	0	0	0	0	0
2	0,200	0,223	0,195	0,206	34,33±1,76
5	0,532	0,488	0,492	0,504	84,00±3,31
6	0,350	0,347	0,407	0,368	61,33±4,60
7	0,467	0,465	0,433	0,455	75,83±2,60
<i>Pseudomonas gessardii</i>					
Den kultivace	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}	a [U/ml]
1	0	0	0	0	0
2	0,071	0,051	0,057	0,060	9,94±1,40
5	0,182	0,223	0,204	0,203	33,83±2,79
6	0,136	0,138	0,160	0,145	24,11±1,81
7	0,156	0,158	0,164	0,159	26,56±0,57
<i>Pseudomonas fulva</i>					
Den kultivace	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}	a [U/ml]
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0,005	0,002	0,28±0,39
5	0,044	0,084	0,039	0,056	9,28±3,36
6	0,120	0,166	0,089	0,125	20,83±5,27
7	0,050	0,041	0,039	0,043	7,22±0,80

Príloha č. 2: Závislosť keratinázovej aktivity na čase kultivácie

<i>Pseudomonas putida</i>					
Den kultivácie	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}	a [U/ml]
1	0,114	0,108	0,119	0,114	9,47±0,37
2	0,148	0,164	0,155	0,156	12,97±0,55
3	0,158	0,146	0,151	0,152	12,64±0,41
4	0,135	0,140	0,128	0,134	11,19±0,41
5	0,153	0,156	0,126	0,145	12,08±1,12
6	0,098	0,090	0,092	0,093	7,78±0,28
7	0,085	0,087	0,091	0,088	7,31±0,21
<i>Pseudomonas gessardii</i>					
Den kultivácie	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}	a [U/ml]
1	0,004	0,003	0,009	0,005	0,44±0,22
2	0,039	0,044	0,055	0,046	3,83±0,56
3	0,029	0,027	0,027	0,028	2,31±0,08
4	0,040	0,030	0,031	0,034	2,81±0,37
5	0,074	0,061	0,063	0,066	5,50±0,48
6	0,062	0,077	0,071	0,070	5,83±0,51
7	0,034	0,071	0,077	0,061	5,06±1,58
<i>Pseudomonas fulva</i>					
Den kultivácie	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}	a [U/ml]
1	0,011	0,007	0,006	0,008	0,67±0,18
2	0,084	0,059	0,104	0,082	6,86±1,53
3	0,035	0,050	0,036	0,040	3,36±0,57
4	0,094	0,099	0,094	0,096	7,97±0,20
5	0,041	0,052	0,054	0,049	4,08±0,48
6	0,030	0,033	0,036	0,033	2,75±0,20
7	0,018	0,024	0	0,014	1,17±0,85